

Aus dem Kaiserin Auguste Victoria Haus Berlin
Universitäts-Kinderklinik der Freien Universität Berlin
(Direktor: Prof. Dr. H. Helge)

Der Einfluß von antibiotischen Präparaten
und deren Lösungsvermittlern
auf das Serum-Bilirubin der jungen Gunn-Ratte
mit und ohne Phototherapie

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

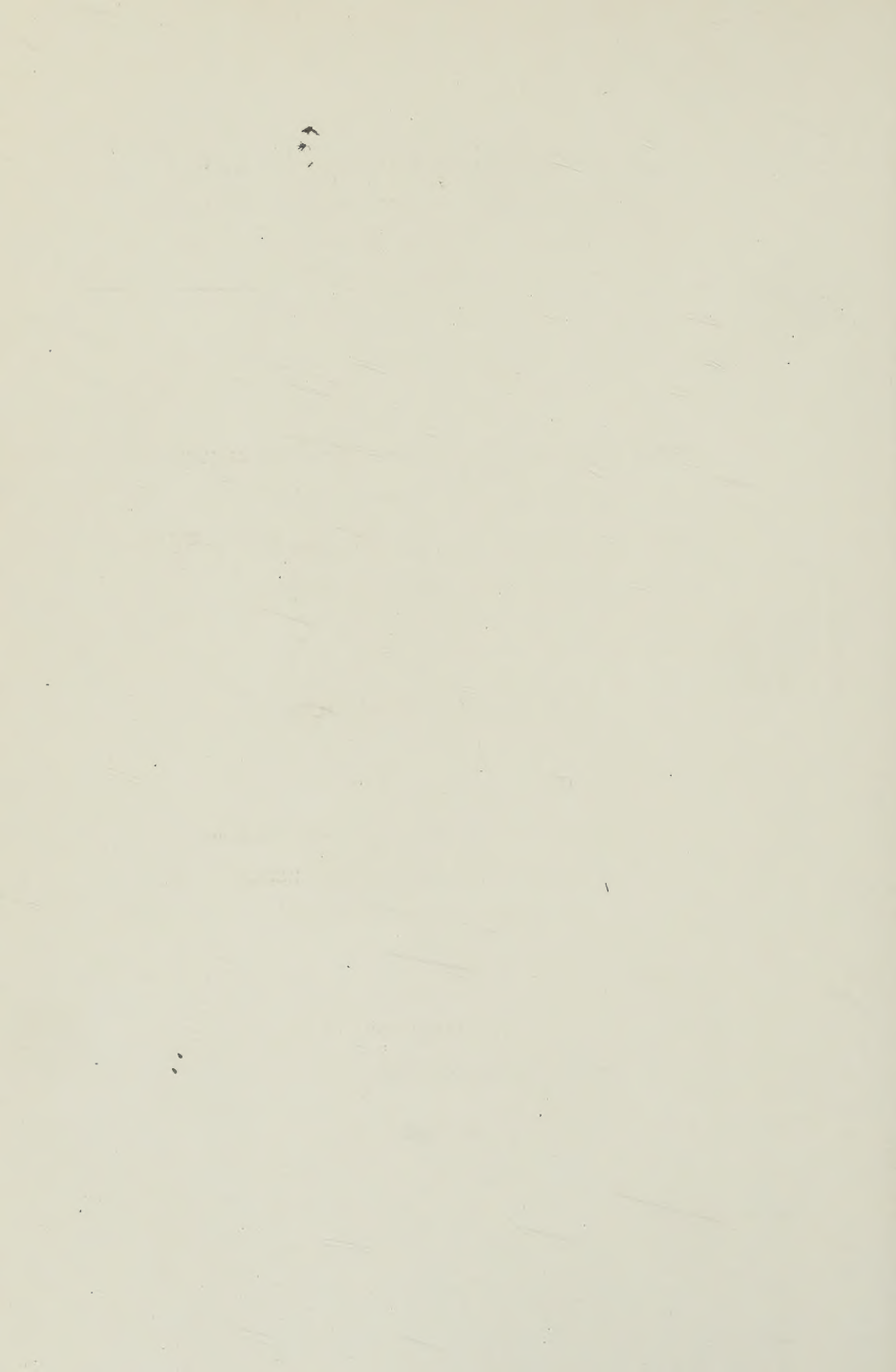
vorgelegt von
Hansjörg Schmid

Lemgo

1976



Digitized by the Internet Archive
in 2026



Aus dem Kaiserin Auguste Victoria Haus Berlin
Universitäts-Kinderklinik der Freien Universität Berlin
(Direktor: Prof. Dr. H. Helge)

**Der Einfluß von antibiotischen Präparaten
und deren Lösungsvermittlern
auf das Serum-Bilirubin der jungen Gunn-Ratte
mit und ohne Phototherapie**

Inaugural-Dissertation

zur

**Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin**

vorgelegt von

Hansjörg Schmid

Lemgo

Referent: Professor Dr. med. L. Ballowitz
Korreferent: Professor Dr. med. N. Rietbrock



Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche
der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 8. September 1976

INHALTSÜBERSICHT

1. EINLEITUNG.....	S. 5- 7
2. METHODIK.....	S. 8-10
3. ERGEBNISSE	
a) BILIRUBIN.....	S. 11-27
b) HÄMATOKRIT.....	S. 28
c) LETALITÄT UND GEWICHT.....	S. 28-43
4. DISKUSSION.....	S. 44-56
5. ZUSAMMENFASSUNG.....	S. 57-58
6. LITERATURVERZEICHNIS.....	S. 59-63

1. EINLEITUNG

Medikamente, die Bilirubin aus der Albuminbindung verdrängen, können bei ikterischen Neugeborenen die Gefahr eines Kernikterus verstärken. Vor allem Frühgeborene mit niedrigem Plasma-Albumin erscheinen gefährdet. Freies, nicht glucuronidiertes und nicht an Albumin gebundenes Bilirubin kann als lipophile Substanz in das Zentralnervensystem eindringen und dort an den Stammhirnkernen Schäden verursachen, die sich makroskopisch und klinisch im Bild des sogenannten Kernikterus manifestieren. An Albumin gebundenes Bilirubin dringt dagegen auf Grund der Molekülgröße nicht in das Zentralnervensystem ein.

In den Jahren 1954/55 hat eine Arbeitsgruppe um SILVERMAN in New-York diesen Zusammenhang klinisch erstmals aufgezeigt. Sie hat die Überlebenschancen und Autopsiebefunde bei drei Gruppen von Frühgeborenen mit Geburtsgewichten von 1000g und weniger, 1001-1500g und 1501g und mehr, verglichen. Die einen hatten zur Infektionsprophylaxe Penicillin und Sulfisoxazol (Gantrisin), die anderen Oxytetracyclin (Terramycin) erhalten. In der Penicillin-Gantrisin-Gruppe starben signifikant mehr Frühgeborene. Bei Autopsien von Kindern, die bis zu fünf Tage alt geworden waren, fand sich bei Gantrisin-Penicillin-Behandelten in 36% ein Kernikterus, bei Oxytetracyclin-Behandelten aber nur in 6%. Penicillin konnte als verantwortliches Agens bald ausgeschlossen werden. Der pathogenetische Zusammenhang mit Sulfonamidinjektionen ließ sich u.a. an Gunn-Ratten (JOHNSON et al. 1959) bald klar herausstellen. Schon SILVERMAN und Mitarbeiter diskutierten, daß eventuell nicht nur das Gantrisin für die Schäden verantwortlich zu machen sei, sondern auch der Lösungsvermittler Diäthanolamin in Betracht gezogen werden müsse.

STERN und SCHIFF wiesen mit Hilfe der Sephadex-Gel-Filtration eine Verdrängung des Bilirubins aus seiner Albumin-Bindung durch Coffeinum-Natrium-Benzoicum und Natrium-Benzoicum, nicht aber durch reines Coffein nach. Außerdem konnten sie freies,

d.h. aus seiner Bindungsstelle am Albuminmolekül verdrängtes Bilirubin nachweisen bei Versuchen mit injizierbarem Diazepam (Valium injectabile) und dessen Lösungsvermittler bzw. Stabilisator, nicht dagegen mit reinem Diazepam. Der Valium-Stabilisator enthält ebenfalls Benzoessäurederivate.

In neuerer Zeit wurden noch mehr Arzneimittel gefunden, die mit dem Bilirubin um dessen Albuminbindungsstelle konkurrieren, einen Anstieg des freien Bilirubins im Plasma bewirken und damit die Gefahr eines Kernikterus erhöhen. STERN z.B. fand bei in-vitro-Tests über die oben angeführten hinaus noch folgende Medikamente: Oxacillin, Hydrocortison, Gentamicin, Digoxin, Sulfadiazin und Meralluridum.

In der Kinderklinik der FU-Berlin besteht seit 1963 eine konventionelle Koloniezucht von Gunn-Ratten. Auf Grund eines genetisch fixierten, angeborenen Enzymdefekts leiden homozygote (jj) Merkmalsträger an einer lebenslangen Erhöhung des indirekten, nicht wasserlöslichen, im Plasma an Albumin gebundenen Bilirubins. Die Tiere eignen sich als Modelle zur Klärung pathogenetischer und therapeutischer Fragestellungen auf dem Gebiet der Hyperbilirubinämie und des Kernikterus. In der hiesigen Kinderklinik sind die Ratten vorwiegend zu experimentellen Studien des Effektes sowie möglicher Nebenwirkungen der Phototherapie verwendet worden. In diesem Rahmen wurden Rattenbabies verschiedene Medikamente injiziert. Es sollte erstens geprüft werden, ob photodynamische Reaktionen durch gleichzeitige Blaulichtbestrahlung eintreten und zweitens, ob durch die Phototherapie das Ausmaß eines durch Medikamente induzierten Kernikterus verringert werden kann. Bei diesen Versuchen stellte man im Frühjahr 1974 fest, daß sich Versuchsergebnisse aus dem Vorjahr bei einer Testserie mit Gentamicin (Refobacin) nicht reproduzieren ließen. In den Protokollbüchern war lediglich die Gentamicindosis vermerkt, nicht jedoch die verwendete Ampullencharge. Nach vielem Experimentieren und Rückfragen bei der Herstellerfirma stellte sich heraus, daß 1973 für die Versuche Refobacin 10mg, 1974 jedoch Refobacin 40mg verwendet worden war. Der Unterschied zwischen diesen beiden Handelsformen liegt einer-

seits am 4-fach höheren Gehalt an Gentamicin in der Refobacin 40mg-Ampulle gegenüber Refobacin 10mg. Doch war diese Differenz durch entsprechendes Verdünnen ausgeglichen worden. Andererseits enthält das Refobacin 10mg - die Säuglingsampulle - bezogen auf 1mg Wirkstoff die 8-fache Menge Benzylalkohol in der Stabilisatorlösung, verglichen mit Refobacin 40mg. Dieser Stabilisator aber, so stellte sich heraus, verdrängt Bilirubin aus seiner Albuminbindung. Da von anderen Medikamenten bereits bekannt war, daß deren Lösungsvermittler bzw. Stabilisatoren, nicht jedoch der Wirkstoff selbst (z.B. injizierbares Valium) eine Bilirubinverdrängung verursachen können, lag es nahe, weitere Arzneimittel auf ihre Stabilisatoren hin zu prüfen.

In der vorliegenden Arbeit soll über einschlägige Untersuchungen mit Sulfisoxazol (Gantrisin), Sulfadimethoxin (Madribon), Gentamicin (Refobacin 10mg und 40mg) sowie Novobiocin (Albamycin) berichtet werden.

Dabei sind vor allem zwei Fragen zu erörtern:

- 1) Haben die o.a. Medikamente bzw. deren Hilfslösungen einen Einfluß auf den Serum-Bilirubinwert der Gunn-Ratte?
- 2) Kann die Phototherapie Schäden verringern, die Wirkstoffe bzw. Hilfslösungen verursachen?

2. METHODIK

Für die Versuche wurden homo- und heterozygote Gunn-Ratten benutzt.

Gunn-Ratten sind Mutanten des Wistar-Stammes. Bei den homozygoten (jj) Tieren fehlt die UDP-Glucuronyltransferase. Der Mangel an diesem in der Leberzelle lokalisierten Enzym verhindert die Überführung des lipoidlöslichen indirekten Bilirubins in das direkte Bilirubin, das in der wasserlöslichen glucuronidierten Form mit der Galle ausgeschieden werden kann. Bei den homozygoten Tieren besteht zeitlebens eine Hyperbilirubinämie. Sie entspricht dem Crigler-Najjar-Syndrom beim Menschen. Die Serumbilirubinkonzentration beträgt nach Untersuchungen von JOHNSON bei 2 Stunden alten Tieren 2mg%, steigt auf 6mg% in der 12. Lebensstunde an, erreicht seinen Höhepunkt etwa am 16. Lebenstag mit 11,5mg%, um dann nach weiteren 14 Tagen auf einen annähernd konstanten Wert von 6-6,5mg% abzufallen. In Folge der hohen Serumbilirubinwerte entsteht bei den meisten homozygoten Tieren ein mehr oder weniger stark ausgeprägter Kernikterus. Er ist klinisch innerhalb der ersten 3 Lebenswochen bei ca. 60% der Tiere nachweisbar. Etwa die Hälfte von diesen stirbt an den Folgen der Bilirubinzephalopathie. Bei heterozygoten (Jj) Gunn-Ratten besteht nur ein partieller Enzymmangel. Diese Tiere weisen kein erhöhtes Serumbilirubin auf. Daher kann man auch homo- und heterozygote Neugeborene schon wenige Stunden nach der Geburt an der unterschiedlichen Hautfarbe unterscheiden.

In den Versuchen wurde ein Teil der Tiere im Dunkeln, der andere Teil unter blauem Licht gehalten.

Unter dem Einfluß von blauem Licht zerfällt das Bilirubin durch Photooxydation in der Haut zu bisher nicht genau definierten Abbauprodukten, die keine toxischen Wirkungen mehr auf das ZNS haben. Die optimale Wellenlänge liegt entsprechend dem

Absorptionsmaximum des Bilirubins von 460nm zwischen 400 und 500nm.

In unseren Versuchen wurden jeweils 6 Spezial-Leuchtstoffröhren, die in diesem Wellenlängenbereich besonders intensiv strahlen (Westinghouse F20 T 12BB), über und unter dem Käfig angebracht. Der Abstand der Lampen zum Käfigboden betrug ca. 30cm, die Temperatur lag zwischen 28 und 30°C. In Höhe der Tiere wurde zwischen 400 und 500nm eine Strahlungsenergie von 3,4mW/cm² ermittelt.

3-5 Tage alte homozygote Ratten wurden nach der Injektion mit verschiedenen Testlösungen in zwei Gruppen aufgeteilt. 50% der Tiere kam unter das Licht, der Rest ins Dunkle. Zu jeder Gruppe wurde ein heterozygoten gleichaltriges, nicht gespritztes Tier zur Laktationskontrolle gegeben. Starb dieses nach mangelhafter Gewichtszunahme, so wurde der Versuch nicht gewertet, da dann eine ungenügende Milchversorgung auch bei den injizierten Tieren nicht ausgeschlossen werden konnte. Während der 4-tägigen Versuchszeit blieb bei jeder Gruppe von Rattenbabies dieselbe säugende Mutter. Um eine gute Milchversorgung zu gewährleisten, erhielt keine Mutter mehr als sieben Junge zum Säugen.

Zu Beginn eines jeden Versuches wurden die Tiere gezeichnet und gewogen. Anschließend wurde aus dem Schwanz Blut entnommen. Das Schwanzende wurde nach der Entnahme mit einer erhitzten Glaskapillare verschorft, um einer Infektion vorzubeugen. Das Blut wurde direkt in heparinisierte Hämatokritkapillaren aufgefangen und dann zentrifugiert. Nach Ablesen des Hämatokritwertes wurde das Gesamt-Serum-Bilirubin bei 461nm gegen einen Glasfilter-Standard von 14mg% photometrisch (mit dem American Optical Bilirubinometer) bestimmt. Dann wurden die verschiedenen Medikamente den Tieren subcutan gespritzt. Nach 30 Minuten, 3, 24 oder 48 Stunden wurde erneut Blut für die Serum-Bilirubinbestimmung abgenommen. Zahlreiche homozygote Tiere wurden nach Abschluß der 4 Tage dauernden Testperiode dekapitiert, das Kleinhirn entnommen, und der Grad des Kern-

ikterus histochemisch an den Purkinje-Zellen des Kleinhirns ermittelt. Diese Untersuchungen wurden von HANEFELD und KRETSCHMER durchgeführt. Sie wurden an anderer Stelle publiziert.

Für die Toxizitätstests wurden 3-5 Tage alte heterozygote Ratten verwendet. Diese wurden gezeichnet, gewogen und mit ansteigenden Dosen des zu untersuchenden Präparates gespritzt.

Alle Tiere wurden während der 4 Tage dauernden Versuche in 24-stündigem Abstand gewogen.

Die getesteten Präparate enthalten nach Angaben der Hersteller:

GENTAMICIN: Refobacin L		kein Stabilisator
Refobacin 10mg*	Na ₂ -EDTA	0,1mg/ml
(=STAB II)	Benzylalkohol	10,0mg/ml
Refobacin 40mg	Na ₂ -EDTA	0,1mg/ml
(=STAB III)	Benzylalkohol	10,0mg/ml
	Na-Pyrosulfit	3,2mg/ml
SULFISOXAZOL (Gantrisin)	Diäthanolamin	?
SULFADIMETHOXIN (Madribon)	Na-Pyrosulfit	0,5mg/ml
	Diäthanolamin	4,2mg/ml
	NaOH	13,0mg/ml
SULFAMETHOXYDIAZIN (Durenat)	Na ₂ -EDTA	0,25mg/ml
CEFAZOLIN (Gramaxin)	HCl-Lidocain	5,0mg/ml
NOVOBIOCIN (Albamycin)	Dimethylacetamid	
	10%-ig	0,094cm ³ /ml
	Benzylalkohol	8,46mg/ml
	Nicotinamid	35mg/ml

* Seit dem Frühjahr 1975 wird von Merck hitzestabilisiertes, Stabilisator-freies Refobacin 10mg vertrieben. In meinen Versuchen wurde ausschließlich das Zusatzstoffe enthaltende Refobacin 10mg aus früherer Produktion verwendet.

3. ERGEBNISSE

a) Bilirubin

In den Abbildungen 1-18 sind Serum-Bilirubinkurven nach der Applikation der verschiedenen Medikamente aufgetragen. Bei allen Tieren wurde zu Beginn der Versuche vor der Injektion das Serumbilirubin bestimmt und mit 100% gleichgesetzt. Die einzelnen Werte schwankten zwischen ca. 7 und 14mg%. Da man bei den kleinen Tieren nicht so häufig Blut abnehmen kann, wurde bei verschiedenen Versuchen mit der gleichen Substanz zu unterschiedlichen Zeiten Blut entnommen. Die sich ent-
sprechenden Werte wurden aufsummiert und in die Kurve einge-
tragen. Den Prozentberechnungen zu Grunde gelegt wurden immer nur die Anfangswerte der analogen Tiere, bei denen das Bili-
rubin zu den einzelnen Zeiten bestimmt wurde und nicht der
mittlere Ausgangswert aller Tiere einer Gruppe.

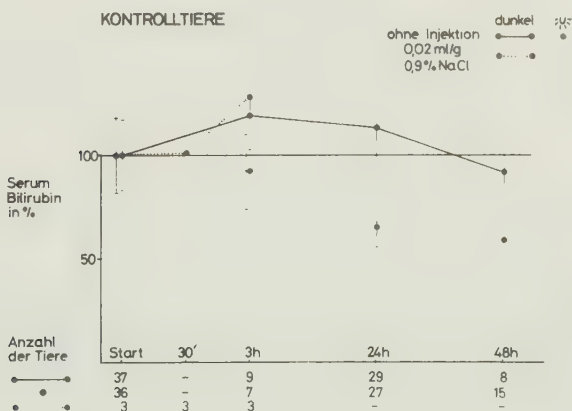


Abb.1. Durchschnittliches Serumbilirubin in Prozent des Ausgangswertes bei homozygoten, 3-5 Tage alten Gunn-Ratten ohne Injektion, bestrahlt (γ) und unbestrahlt (dunkel). Näheres siehe Text.

Abbildung 1 zeigt den Kurvenverlauf bei homozygoten Kontrolltieren, schwarz ausgezogen für die Tiere ohne Injektion im Dunkeln. In den ersten 3 Stunden steigen die Werte leicht an, möglicherweise bedingt durch die Irritation der Rattenjungen wie Zeichnen, Wiegen, Umsetzen in neue Käfige usw. Nach Anpassung der Tiere fällt die Konzentration wieder auf den ursprünglichen Wert ab. Die Werte der bestrahlten Tiere (schwarze Punkte) liegen auf einer abfallenden Kurve - schon nach 3 Stunden unter der Kurve der im Dunkeln gehaltenen Tiere. Nach 24 Stunden wird nahezu ein Tiefpunkt erreicht, der bei 60% des Ausgangswertes liegt und während der nächsten Tage etwa konstant bleibt. Die punktierte Linie wurde nach Injektion von 0,02ml/g physiologischer Kochsalzlösung bei im Dunkeln gehaltenen Tieren erstellt. Sie unterscheidet sich kaum von der der ungespritzten Kontrolltiere im Dunkeln.

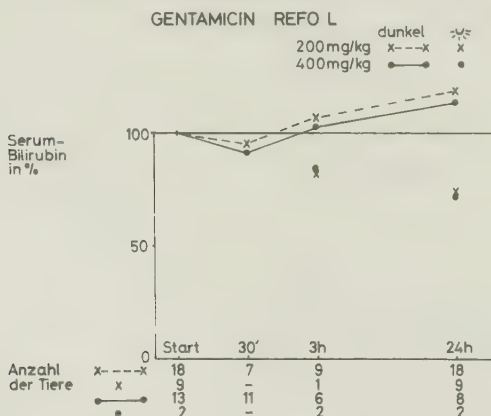


Abb.2a. Durchschnittliches Serumbilirubin in Prozent des Ausgangswertes bei homozygoten, 3-5 Tage alten Gunn-Ratten nach Injektion verschiedener Dosen Refobacin L, bestrahlt (☼) und unbestrahlt (dunkel). Näheres siehe Text.

Abbildung 2a: Refobacin L ist reines, lyophilisiertes Gentamicin ohne Stabilisatorzusätze. In beiden Dosierungen von 200 und 400mg/kg ist bei den unbestrahlten Tieren nach einem an-

fänglichen leichten Bilirubinabfall ein erneutes Ansteigen festzustellen, ähnlich dem der Kontrolltiere. Auch die Kurve der bestrahlten Tiere unterscheidet sich von der der entsprechenden Kontrolltiere nur unwesentlich. Man kann also annehmen, daß reines Gentamicin mit dem Bilirubin nicht um dessen Bindung am Albuminmolekül konkurriert und daher keinen Abfall des Serum-Bilirubins verursacht.

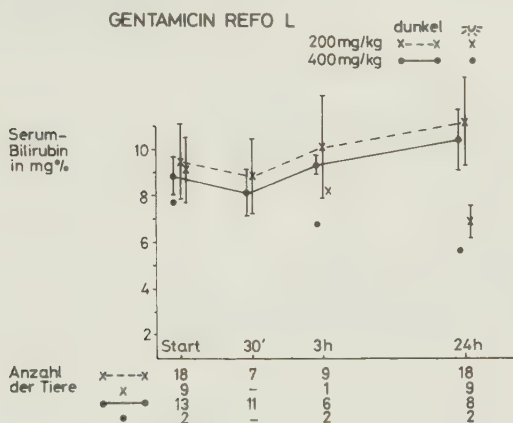


Abb.2b. Durchschnittliches Serumbilirubin mit Standardabweichungen in mg% bei homozygoten, 3-5 Tage alten Gunn-Ratten nach Injektion verschiedener Dosen Refobacin L, bestrahlt (x) und unbestrahlt (dunkel). Näheres siehe Text.

In den Abbildungen 2b und 4b wurde beispielhaft für Refobacin L und Refobacin 10mg das Serum-Bilirubin nicht in Prozenten ausgedrückt, sondern in mg%, und die Standardabweichungen eingetragen. Bei dieser Darstellungsweise werden die Schwankungen der Ausgangswerte bei den einzelnen Versuchen deutlich. Die dargestellten Ausgangswerte (und Standardabweichungen) umfassen hierbei alle Tiere. Wenn spätere Blutentnahmen nur bei einem Teil der Tiere vorgenommen wurde, können die genauen Ausgangswerte dieser Gruppe nicht entnommen werden.

Abbildung 3: In derselben Dosierung wie Refobacin L verursacht Refobacin 40mg, ein Gentamicinpräparat mit Stabilisatorzusatz

(1ml Lösung enthält 10mg Gentamicin). 30 Minuten nach Injektion einen deutlich feststellbaren Bilirubinabfall, der bei den unbestrahlten Tieren bald wieder nachläßt, so daß nach 24 Stunden etwa derselbe Wert erreicht ist wie beim Refobacin I. Unter Phototherapie bleibt bei beiden Dosierungen die Bilirubinkonzentration etwa bei der 75%-Marke.

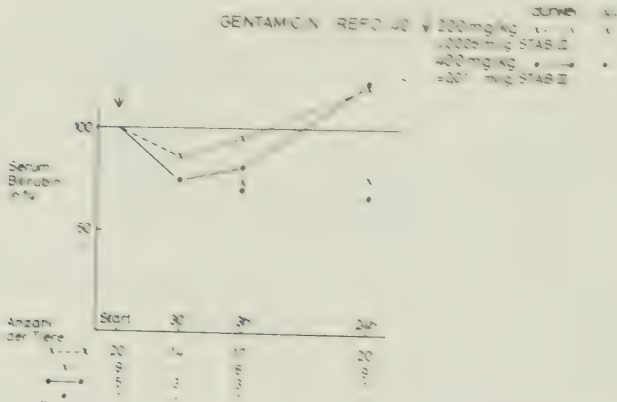


Abb.3. Durchschnittliches Serumbilirubin in Prozent des Ausgangswertes bei homozygoten, 3-5 Tge alten Gunn-Ratten nach Injektion verschiedener Dosen Refobacin 10mg, unbestrahlt (dunkel) und bestrahlt (STAB II). Näheres siehe Text.

Abbildung 4a: Praktischer als beim Refobacin 10mg ist der Bilirubinabfall beim Refobacin 10mg (1ml Lösung enthält 10mg Gentamicin), der Interjektionsform für Säuglinge und Kleinkinder. In der Dosierung von 10mg/kg entspricht der Kurvenverlauf etwa dem nach 200mg/kg Refobacin 10mg. Im Gegensatz zu Refobacin 10mg (400mg/kg) wird der Ausgangswert beim Refobacin 10mg (100mg/kg) erst zwischen 11 und 16 Stunden erreicht. Noch deutlicher ist dies bei 200mg/kg Refobacin 10mg zu sehen. Die Kurve fällt kontinuierlich bis zu 24 Stunden nach der Injektion ab, später waren keine weiteren Messungen möglich. Da die homozygoten Tiere diese Dosis nicht länger überlebten, auch fällt der 24-Stundenwert der bestrahlten Tiere mit dem der unbestrahlten zusammen.

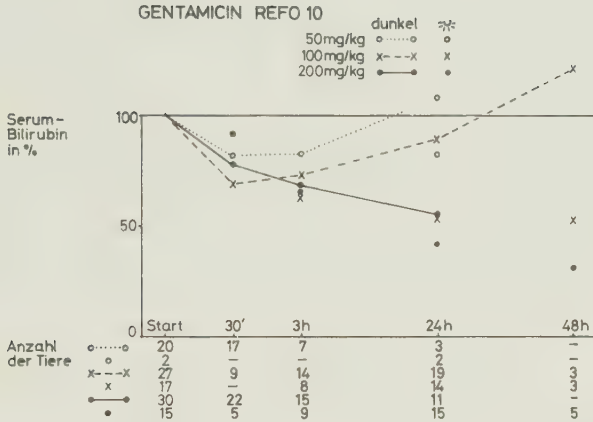


Abb.4a. Durchschnittliches Serumbilirubin in Prozent des Ausgangswertes bei homozygoten, 3-5 Tage alten Gunn-Ratten nach Injektion verschiedener Dosen Refobacin 10mg, bestrahlt (☐) und unbestrahlt (dunkel). Näheres siehe Text.

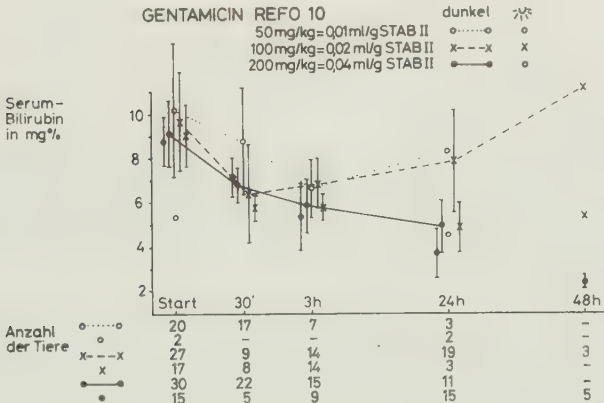


Abb.4b. Durchschnittliches Serumbilirubin mit Standardabweichungen in mg% bei homozygoten, 3-5 Tage alten Gunn-Ratten nach Injektion verschiedener Dosen Refobacin 10mg, bestrahlt (☐) und unbestrahlt (dunkel). Näheres siehe Text.

In der Abbildung 4b - Darstellung der absoluten Bilirubinwerte mit Standardabweichung - ergibt sich in der Dosierung 50mg/kg bei den Tieren im Dunkeln ein deutlicher Unterschied zur Prozentdarstellung. Für die 7 Tiere, bei denen nach 3 Stunden ein Mittelwert von $6,6 \pm 1,3 \text{ mg\%}$ errechnet wurde, ist der Ausgangswert von $10,2 \pm 3,0 \text{ mg\%}$ (20 Tiere) nicht repräsentativ. Er beträgt für diese 7 Tiere $8,0 \pm 2,6 \text{ mg\%}$. Nach 30 Minuten wurde bei den gleichen 7 Tieren ein Mittelwert von $6,3 \pm 1,4 \text{ mg\%}$ ermittelt (nach 24 Stunden wurde von diesen 7 Tieren kein Bilirubin mehr bestimmt). Dieses Beispiel - siehe dazu die Abbildung 4c - zeigt, daß unter den gegebenen Umständen - Blut-

GENTAMICIN REFO 10
50mg/kg dunkel

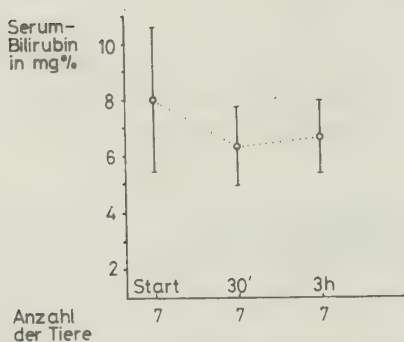


Abb.4c. Durchschnittliches Serumbilirubin mit Standardabweichungen in mg% bei 7 homozygoten, 3-5 Tage alten Gunn-Ratten nach Injektion von 50mg/kg Refobacin 10mg, unbestrahlt (dunkel). Näheres siehe Text.

entnahmen zu den verschiedenen Zeiten nur bei einem Teil der Tiere möglich - der Prozentdarstellung nicht nur aus Gründen der besseren Übersichtlichkeit der Vorzug zu geben ist. Der Bilirubinabfall 3 und 24 Stunden nach 200mg/kg Refobacin 10mg kann in der Abbildung 4b als statistisch signifikant gesehen werden (Differenz größer als 2 Standardabweichungen).

Der unterschiedliche Kurvenverlauf nach Refobacin L ohne Bili-

rubinverdrängung gegenüber mäßiger bei Refobacin 40mg und kräftiger bei Refobacin 10mg läßt die Vermutung zu, daß der Stabilisator von Refobacin 10mg und 40mg diese Verdrängung verursacht.

Es sei darauf hingewiesen, daß HANEFELD und KRETSCHMER an den Purkinje-Zellen des Kleinhirns der Tiere, die Refobacin 10mg erhalten hatten, wesentlich stärkere Ganglienzellschäden (Kernikterusfolgen) nachweisen konnten als bei gleichalten homozygoten Kontrolltieren oder solchen, die mit entsprechenden Mengen Refobacin L behandelt worden waren.

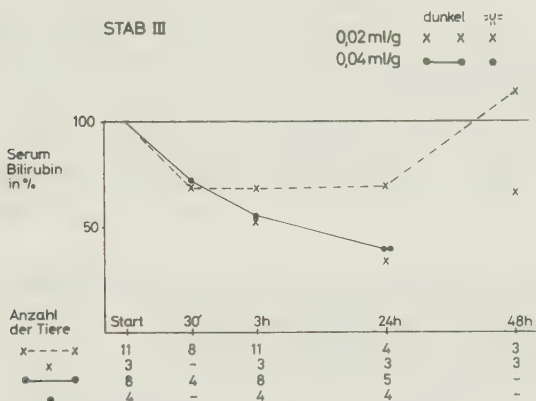


Abb.5. Durchschnittliches Serumbilirubin in Prozent des Ausgangswertes bei homozygoten, 3-5 Tage alten Gunn-hatten nach Injektion verschiedener Dosen STAB III, bestrahlt ($\frac{UV}{\lambda}$) und unbestrahlt (dunkel). Näheres siehe Text.

In Abbildung 5 wird das Ergebnis der Bilirubinmessung nach STAB III, dem Stabilisator des Refobacin 40mg, dargestellt. Die Hilfsstoffe in Refobacin 10mg wurden als STAB II bezeichnet. Beide Stabilisatoren, STAB II und STAB III, enthalten Na_2 -EDTA und Benzylalkohol, STAB III außerdem noch Na-Pyrosulfit. (Eine Liste mit der Zusammensetzung aller Stabilisatoren findet sich weiter oben auf Seite 10.) Na-Pyrosulfit

verursacht allein keine Bilirubinverdrängung. Daher läßt sich die Kurve von STAB III gut mit der des Refobacin 10mg vergleichen. Legt man beide übereinander, kommen sie fast zur Deckung. Das bedeutet, daß die Bilirubinverdrängung des Refobacin 10mg und 40mg praktisch nur durch den darin enthaltenen Stabilisator verursacht wird.

Die Unterschiede im Kurvenverlauf von Refobacin 10mg und 40mg bei gleicher Dosierung erklären sich dadurch, daß im Refobacin 10mg, auf den Wirkstoff bezogen, 8-mal mehr Stabilisator enthalten ist als im Refobacin 40mg.

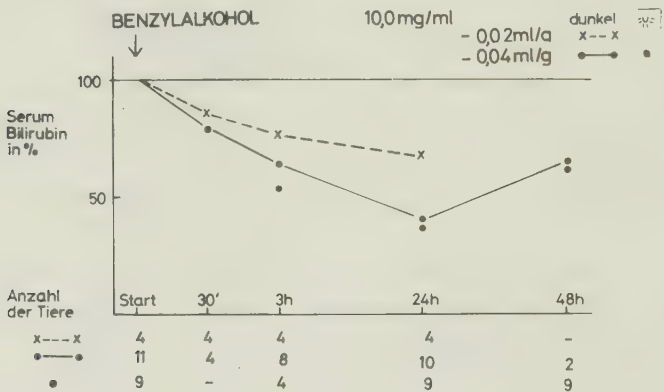


Abb.6. Durchschnittliches Serumbilirubin in Prozent des Ausgangswertes bei homozygoten, 3-5 Tage alten Gunn-Ratten nach Injektion verschiedener Dosen Benzylalkohol, bestrahlt (☼) und unbestrahlt (dunkel). Näheres siehe Text.

In Abbildung 6 wird Benzylalkohol auf seine Bilirubin-verdrängende Wirkung hin untersucht. Der Kurvenverlauf entspricht weitgehend dem des STAB III. Offensichtlich bindet sich Benzylalkohol stark an das Plasma-Albumin und verdrängt dort das Bilirubin.

Abbildung 7: Na₂-EDTA, ein Komplexbildner, hat, wie aus der Kurve zu schließen ist, keinen Effekt auf die Bilirubin-Albumin-Bindung. Man kann folgern, daß für die Bilirubinverdrängung

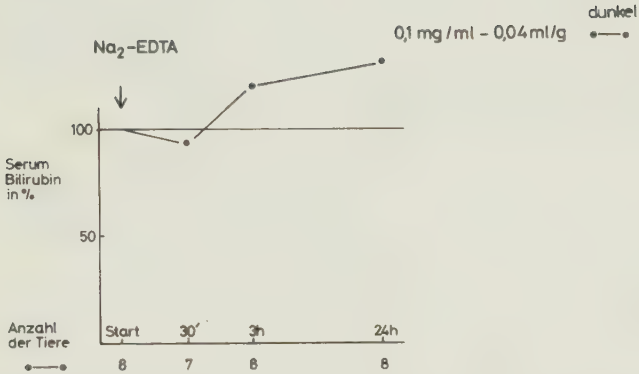


Abb.7. Durchschnittliches Serumbilirubin in Prozent des Ausgangswertes bei homozygoten, 3-5 Tage alten Gunn-Ratten nach Injektion von 0,04ml/g Na₂-EDTA, unbestrahlt (dunkel). Näheres siehe Text.

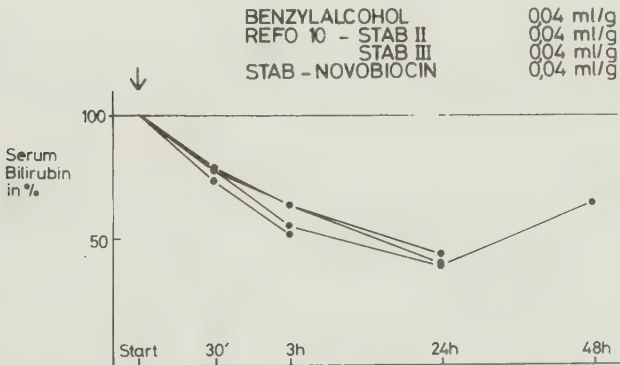


Abb.8. Durchschnittliches Serumbilirubin in Prozent des Ausgangswertes bei homozygoten, 3-5 Tage alten Gunn-Ratten nach Injektion von je 0,04ml/g Benzylalkohol, Refobacin 10mg (STAB II) STAB III und STAB-Novobiocin (Stabilisator von Albamycin), unbestrahlt. Näheres siehe Text.

In Abbildung 8 wurden Benzylalkohol, Refobacin 10mg (STAB II), STAB III und außerdem der Stabilisator von Albamycin (mit STAB-Novobiocin bezeichnet - er wird später noch näher besprochen), in eine Kurve eingezeichnet. Man erkennt einen nahezu deckungsgleichen Kurvenverlauf aller Lösungen. STAB-Novobiocin enthält wie Refobacin 10mg und 40mg Benzylalkohol in vergleichbarer Menge.

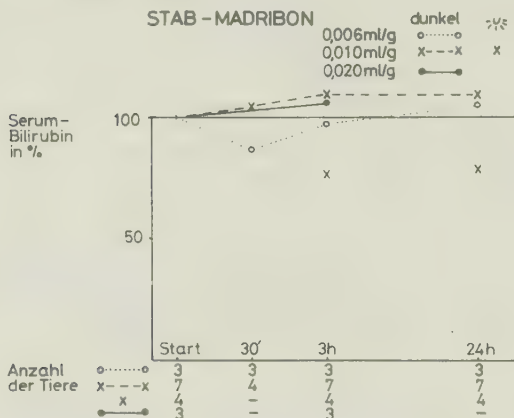


Abb.9. Durchschnittliches Serumbilirubin in Prozent des Ausgangswertes bei homozygoten, 3-5 Tage alten Gunn-Ratten nach Injektion des Stabilisators von Madribon, bestrahlt (X) und unbestrahlt (dunkel). Näheres siehe Text.

Abbildung 9: Der Stabilisator des Madribons (STAB-Madribon) enthält Na-Pyrosulfit, Diäthanolamin und NaOH. Bei den verabreichten Dosen läßt sich nur bei der kleinsten von 0,006ml/g ein ganz leichter Abfall der Kurve innerhalb der ersten 30 Minuten beobachten, der jedoch nicht signifikant ist. Der leichte Anstieg der Bilirubinkonzentration bei den höheren Dosen beruht wohl teilweise - wie bei den Kontrolltieren - auf der Irritation der Rattenbabies beim Spritzen, Blut-Abnehmen etc., daneben möglicherweise auf dem hohen Gehalt an NaOH im Stabilisator, der einen pH von 9,4 aufweist und die Stoffwechsellaage der Tiere zur alkalischen Seite verschiebt. Ins-

gesamt läßt der Kurvenverlauf den Schluß zu, daß der Stabilisator des Madribons keine Stoffe enthält, die das Bilirubin aus seiner Albuminbindung verdrängen.

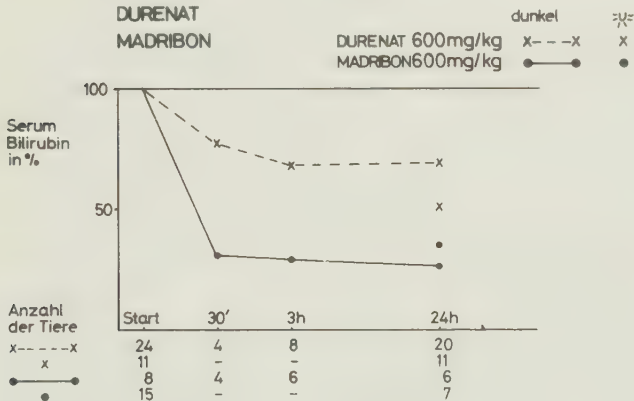


Abb.10. Durchschnittliches Serumbilirubin in Prozent des Ausgangswertes bei homozygoten, 3-5 Tage alten Gunn-Ratten nach Injektion von jeweils 600mg/kg Durenat und Madribon, bestrahlt (x) und unbestrahlt (dunkel). Näheres siehe Text.

In Abbildung 10 wurden die Kurven von Durenat (Sulfamethoxydiazin) und Madribon (Sulfadimethoxin) bei gleicher Dosierung von 600mg/kg in ein Schaubild eingetragen. Die Einzelwerte dieser Kurven wurden der Dissertationsschrift von KRISPONEIT entnommen. Trotz der Ähnlichkeit der chemischen Verbindungen liegt bei Durenat der nach 3 Stunden erreichte Bilirubinwert mit ca. 70% wesentlich über dem des Madribons, der bei 30% liegt. Man kann daraus schließen, daß die Affinität des Sulfadimethoxins zum Albumin und dessen Konkurrenz um die vom Bilirubin besetzte Bindungsstelle am Albumin größer ist als die des Sulfamethoxydiazins. Wie auch schon beim Madribon-Stabilisator, so hat auch der Na₂-EDTA enthaltende Durenat-Stabilisator keinen Einfluß auf die Bilirubinbindung und beeinflusst daher den Kurvenverlauf nicht.

Abbildung 11: (Aus der Dissertationsschrift KRISPONEIT) Hier

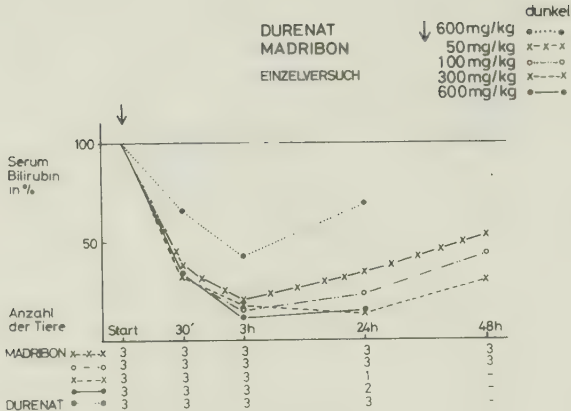


Abb.11. Durchschnittliches Serumbilirubin in Prozent des Ausgangswertes bei homozygoten, 3-5 Tage alten Gunn-Ratten nach Injektion von Durenat und Madribon, unbestrahlt (dunkel). Alle Tiere stammen aus einem Wurf. Näheres siehe Text.

wurden 15 Tiere aus einem Wurf mit 600mg/kg Durenat und verschiedenen Dosen Madribon gespritzt. Der Bilirubinabfall entspricht weitgehend dem in der letzten Abbildung, doch ist die geringe Dosisabhängigkeit beim Madribon auffällig. Erst nach 24 Stunden läßt sich die 50mg/kg-Kurve durch ihren kräftigen Anstieg deutlich von der 600mg/kg-Kurve unterscheiden.

Abbildung 12: Die Kurven der Stabilisatoren des Madribons und Gantrisins wurden in ein Schaubild gezeichnet. Nachdem der Madribon-Stabilisator (Abb.9) keine Verdrängung verursachte, war dies für den ebenfalls Diäthanolamin enthaltenden Gantrisin-Stabilisator zu erwarten. Die Abbildung bestätigt dies, indem beide Kurven nach 3 Stunden mäßig ansteigen.

Abbildung 13: (Aus der Dissertationsschrift KRISPONEIT) Es wurde Gantrisin (Sulfisoxazol) mit Stabilisator gespritzt. Es erfolgt ein Bilirubinabfall in den ersten 30 Minuten unter 50% des Ausgangswertes. Die Kurve erreicht 3 Stunden nach der Injektion ihren Tiefpunkt. Danach steigt sie deutlich wieder

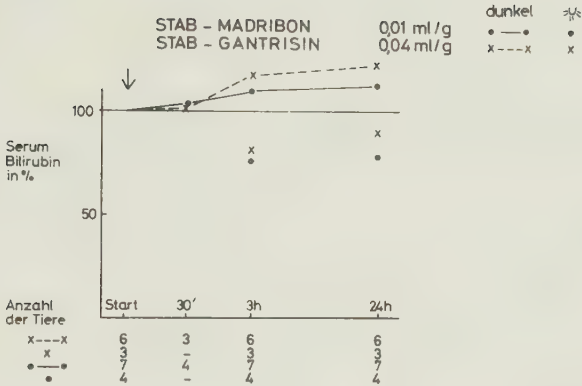


Abb.12. Durchschnittliches Serumbilirubin in Prozent des Ausgangswertes bei homozygoten, 3-5 Tage alten Gunn-Ratten nach Injektion von STAB-Madribon und STAB-Gantrisin, bestrahlt (☀) und unbestrahlt. Näheres siehe Text.

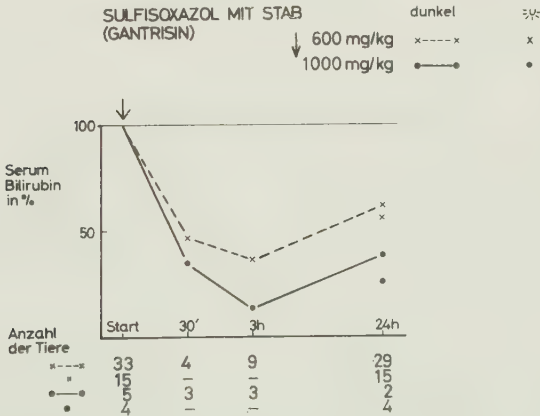


Abb.13. Durchschnittliches Serumbilirubin in Prozent des Ausgangswertes bei homozygoten, 3-5 Tage alten Gunn-Ratten nach Injektion von Gantrisin, bestrahlt (☀) und unbestrahlt (dunkel). Näheres siehe Text.

an. In der Steilheit des Kurvenabfalls erinnert das Sulfisoxazol an das Sulfadimethoxin (Madribon), das ebenfalls eine solch starke Bindungskonkurrenz mit dem Bilirubin aufweist. Die Werte der bestrahlten Tiere liegen um wenig unter denen der nicht bestrahlten.

Abbildung 14: Der Stabilisator des Gramaxins (Cefazolin) enthält in der Packung zur i.m.-Injektion als Lokalanästhetikum HCl-Lidocain, das auf seine Wirkung bezüglich der Bilirubinverdrängung untersucht wurde. Der Kurvenverlauf ähnelt dem der Kontrolltiere in Abbildung 1, d.h. Lidocain hat keine Bilirubin-verdrängenden Eigenschaften.

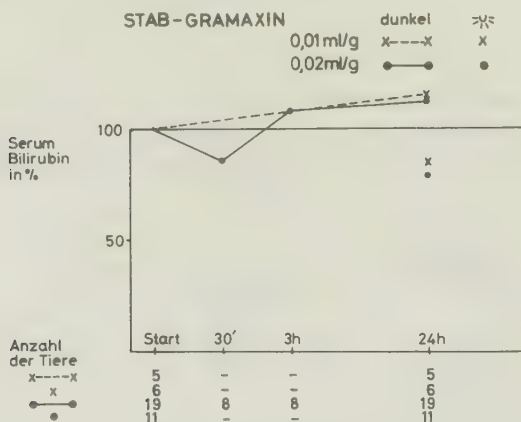


Abb.14. Durchschnittliches Serumbilirubin in Prozent des Ausgangswertes bei homozygoten, 3-5 Tage alten Gunn-Ratten nach Injektion von STAB-Gramaxin, bestrahlt (☒) und unbestrahlt (dunkel). Näheres siehe Text.

Abbildung 15: In einer Dosierung von 100mg/kg wurde Novobiocin mit Stabilisator (Albamycin) getestet. Leider fehlen die Werte 30 Minuten nach der Injektion. 3 Stunden nach der Injektion liegt das Serum-Bilirubin bei den unbestrahlten Tieren etwas unterhalb des Ausgangswertes. In einer Dosis von 100mg/kg sind 0,001ml/g Stabilisator enthalten.

Abbildung 16: Novobiocin wurde in 0,9%-iger NaCl-Lösung auf-

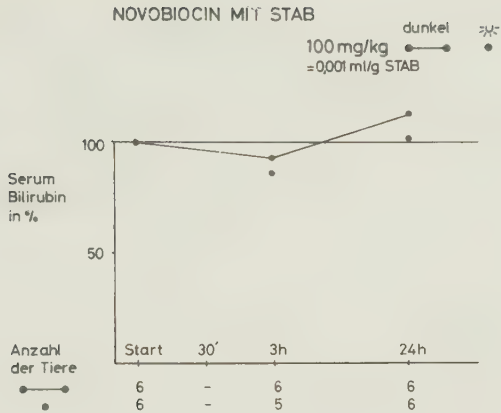


Abb.15. Durchschnittliches Serumbilirubin in Prozent des Ausgangswertes bei homozygoten, 3-5 Tage alten Gunn-Ratten nach Injektion von 100mg/kg Novobiocin mit STAB, bestrahlt (☼) und unbestrahlt (dunkel). Näheres siehe Text.

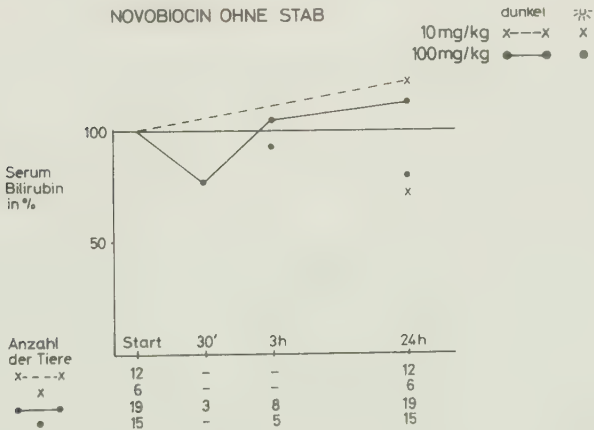


Abb.16. Durchschnittliches Serumbilirubin in Prozent des Ausgangswertes bei homozygoten, 3-5 Tage alten Gunn-Ratten nach Injektion verschiedener Dosen Novobiocin ohne STAB, bestrahlt (☼) und unbestrahlt (dunkel). Näheres siehe Text.

gelöst und in Dosen von 10 und 100mg/kg gespritzt. 100mg/kg verursachen zwar einen Abfall der Kurve bis 30 Minuten nach der Injektion, doch ist der Ausgangswert bereits nach 3 Stunden wieder überschritten. Es läßt sich daraus keine lang anhaltende Konkurrenz des Novobiocins mit dem Bilirubin um dessen Albuminbindungsstelle ableiten.

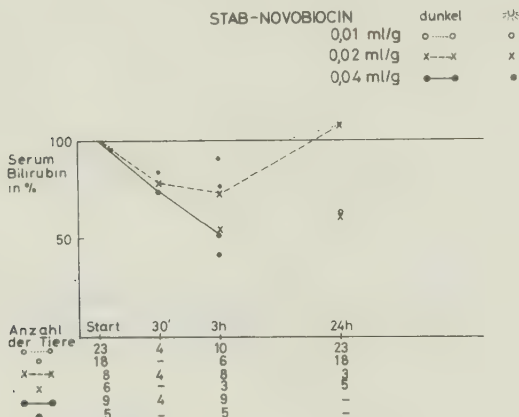


Abb.17. Durchschnittliches Serumbilirubin in Prozent des Ausgangswertes bei homozygoten, 3-5 Tage alten Gunn-Ratten nach Injektion verschiedener Dosen STAB-Novobiocin, bestrahlt (☉) und unbestrahlt (dunkel). Näheres siehe Text.

Abbildung 17: In einer um ca. eine Zehnerpotenz höheren Dosis im Vergleich zu der in Abbildung 15 injizierten wurde der Stabilisator des Albamycins (STAB-Novobiocin) gespritzt. Es zeigt sich, daß bei jeder Dosis (0,01, 0,02 oder 0,04ml/g) ein Bilirubinabfall festzustellen ist. Er ist am deutlichsten bei der höchsten Dosierung und fällt dort nach 3 Stunden bis auf die 50%-Linie ab. Diese Menge überlebte kein Tier für 24 Stunden, so daß der entsprechende Wert nicht eingetragen ist. Nach 24 Stunden wird bei 0,01ml/g und 0,02ml/g der Ausgangswert wieder überschritten. Auf die Ähnlichkeit zu den Refobacin-Stabilisatoren STAB II und STAB III wurde bereits hingewiesen.

Abbildung 18: Dimethylacetamid, Bestandteil des Albamycin-

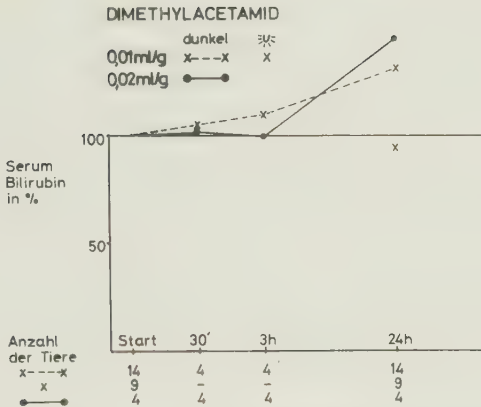


Abb.18. Durchschnittliches Serumbilirubin in Prozent des Ausgangswertes bei homozygoten, 3-5 Tage alten Gunn-Ratten nach Injektion verschiedener Dosen Dimethylacetamid, bestrahlt (☼) und unbestrahlt (dunkel). Näheres siehe Text.

-Stabilisators, wurde im Verhältnis 1:10 mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt und in Dosen von 0,01 und 0,02ml/g injiziert. Dabei konnte kein Abfall der Serumbilirubin-Konzentration festgestellt werden, die 100%-Marke wurde nur von belichteten Tieren unterschritten: Keine Konkurrenz um die Bindungsstelle.

Der rapid ansteigende Bilirubinwert erklärt sich durch die Toxizität des Dimethylacetamid. Bis zu 24 Stunden nach der Injektion nahmen die Tiere nicht zu - obwohl sie volle Mägen hatten. Möglicherweise erzeugt das organische Lösungsmittel oder dessen Metaboliten Stoffwechselstörungen, die zu einem Anstieg des Serum-Bilirubins führen.

Außer Dimethylacetamid enthält der Albamycin-Stabilisator noch Nicotinsäureamid, ein Vitamin der B-Gruppe, und Benzylalkohol, der schon allein gespritzt wurde (Abb.6). Er scheint wiederum der einzige Bestandteil des Stabilisators zu sein, der eine Bilirubinverdrängung verursacht.

b) Hämatokrit

Regelmäßig wurde vor Bestimmung des Gesamt-Bilirubins der Hämatokrit (Hkt) ermittelt. Es konnten keine gesetzmäßigen Zuordnungen unterschiedlicher Hkt-Werte zur Höhe des Bilirubins bei bestrahlten oder unbestrahlten Tieren gefunden werden. Insgesamt schwankten die Werte erheblich. Es ließ sich lediglich zeigen, daß der Hämatokrit mit der Zahl der Blutentnahmen abnahm. Dabei stellte sich heraus, daß weniger der Zeitpunkt als vielmehr die Anzahl der Blutentnahmen ausschlaggebend war. Wir fanden keine Hinweise auf eine durch die Medikamente und/oder die Phototherapie bedingte Hämolyse.

c) Letalität und Gewicht

In Vorversuchen mit nicht bestrahlten, heterozygoten (Jj) Rattenbabies wurde die akute Toxizität (4-Tage-Überlebensrate) der einzelnen Präparate bestimmt. Die Ergebnisse dieser Untersuchung wurden zusammen mit der 4-Tage-Überlebensrate und Gewichtszunahme der homozygoten Tiere in die Tabellen 2-13 gefaßt, die sich bei der Besprechung des jeweiligen Präparates finden.

Für jedes Präparat wurde eine Konzentrations-Letalitäts-Kurve (Beispiele siehe Abbildung 19 und 20) aufgestellt. Auf der Abszisse wurde der Prozentsatz der verstorbenen Tiere, auf der Ordinate die Dosierung der Medikamente (darunter die Anzahl der jeweils gespritzten Tiere) eingetragen. Anhand dieser Schaubilder wurde - dem Vorgehen von BEHRENS und KÄRBER entsprechend - die LD 50, d.h. diejenige Konzentration eines Wirkstoffes festgelegt, bei der die Hälfte aller Tiere starb. Die für die einzelnen Präparate gefundenen Mengen sind erstens in der Tabelle 1 aufgeführt und zweitens mit einem Pfeil markiert in den Tabellen 3-13. Dabei bedeutet ein nach unten weisender Pfeil, daß die L.D.50 über der angezeigten Dosis liegt.

Tabelle 1

L.D.50 von homo- und heterozygoten 3-5 Tage alten Gunn-Ratten nach einmaliger s.c.-Injektion verschiedener Substanzen. Näheres siehe Text.

<u>Präparat</u>	heterozygot		homozygot	
	<u>dunkel</u>	<u>hell</u>	<u>dunkel</u>	<u>hell</u>
REFOBACIN 10mg	375mg/kg ±0,075ml/g	375mg/kg ±0,075ml/g	130mg/kg ±0,026ml/g	170mg/kg ±0,034ml/g
REFOBACIN 40mg	650mg/kg ±0,017ml/g		475mg/kg ±0,012ml/g	500mg/kg ±0,013ml/g
REFOBACIN L	700mg/kg		>400mg/kg	>400mg/kg
STAB III	0,07ml/g	0,07ml/g	0,025ml/g	>0,04ml/g
BENZYLALKOHOL	0,07ml/g	0,06ml/g	0,025ml/g	0,05ml/g
Na ₂ -EDTA			>0,04ml/g	
STAB-GRAMAXIN	0,03ml/g	0,04ml/g	0,025ml/g	0,03ml/g
STAB-MADRIBON	0,013ml/g	0,005ml/g	0,013ml/g	0,005ml/g
STAB-GANTRISIN	>0,06ml/g	>0,06ml/g	>0,06ml/g	>0,06ml/g
DIMETHYLACETAMID (10%-ige Lösung)	0,018ml/g		0,018ml/g	0,02ml/g
NOVOBIOCIN MIT STAB	250mg/kg ±0,003ml/g		>100mg/kg ±0,001ml/g	>100mg/kg ±0,001ml/g
STAB-NOVOBIOCIN	0,015ml/g		0,015ml/g	0,015ml/g
NOVOBIOCIN OHNE STAB	280mg/kg		>100mg/kg	>100mg/kg

Für die verschiedenen Refobacin-Präparate findet sich in Abbildung 19 das Schaubild der Letalitätskurven. Daraus wird deutlich, daß Refobacin 40mg mit einer L.D.50 von 650mg/kg (±ca. 0,017ml/g STAB III) etwa 2-mal weniger toxisch ist als Refobacin 10mg mit einer L.D.50 von 375mg/kg (±0,075ml/g STAB II). Die geringere Toxizität des Refobacin 40mg läßt sich, offensichtlich auch bei heterozygoten Tieren, auf den 8-fach geringeren Gehalt an Stabilisator im Refobacin 40mg zurückführen. Ebenfalls gering toxisch ist Refobacin L mit einer L.D.50 von 700mg/kg.

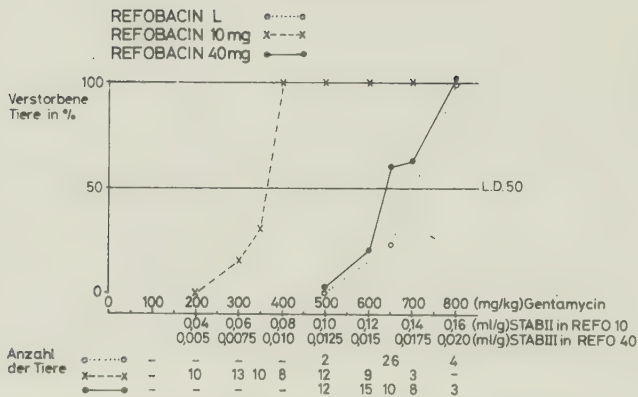


Abb.19. Dosis-Letalitätskurve von heterozygoten 3-5 Tage alten Gunn-Ratten nach Injektion verschiedener Dosen Refobacin 10mg, Refobacin 40mg und Refobacin L. Näheres siehe Text.

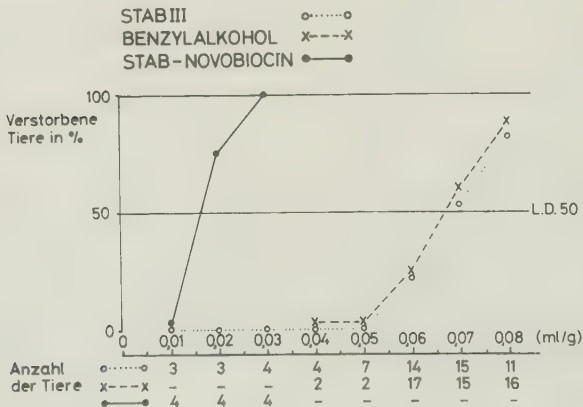


Abb.20. Dosis-Letalitätskurve von heterozygoten 3-5 Tage alten Gunn-Ratten nach Injektion verschiedener Dosen STAB III, STAB-NOVOBIOCIN und Benzylalkohol. Näheres siehe Text.

Abbildung 20 zeigt die Letalitätskurven der Stabilisatoren von Refobacin 40mg (STAB III) und Albamycin (STAB-Novobiocin) und deren wichtigstem Bestandteil, dem Benzylalkohol. Dabei ergibt sich für STAB III eine L.D.50 von 0,07ml/g, die identisch ist mit der des Benzylalkohols und des Refobacin 10mg. Für STAB-Novobiocin wurde dagegen 0,015ml/g abgelesen. Es muß angenommen werden, daß in STAB III und STAB II der Benzylalkohol im Wesentlichen die L.D.50 bestimmt, im Novobiocin-Stabilisator hingegen die Kombination mit den übrigen Bestandteilen von Bedeutung ist.

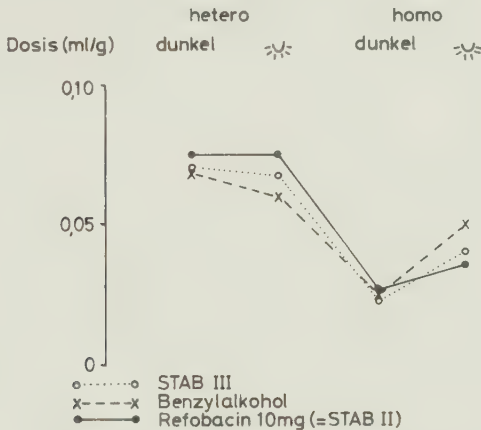


Abb.21. Schaubild der L.D.50 hetero- und homozygoter, bestrahlter und unbestrahlter 3-5 Tage alter Gunn-Ratten nach Injektion von Refobacin 10mg, STAB III und Benzylalkohol. Näheres siehe Text.

Abbildung 21: Zusätzlich zu diesen Abbildungen wurde in ein Schaubild die L.D.50 bestrahlter und unbestrahlter, homo- und heterozygoter Tiere nach Injektion von STAB III, Benzylalkohol und Refobacin 10mg eingezeichnet. Dabei zeigt sich eindrucksvoll die Übereinstimmung aller drei Kurven. Hierdurch wird noch einmal unterstrichen, daß in STAB III und Refobacin 10mg $\hat{=}$ STAB II im Wesentlichen der Benzylalkohol die L.D.50 bestimmt.

In einer besonderen Studie wurde die akute Toxizität von Refobacin 10mg, STAB III und Benzylalkohol, sowie der Stabilisatoren von Madribon, Gantrisin und Gramaxin bei bestrahlten und im Dunkeln gehaltenen heterozygoten jungen Ratten verglichen (siehe Tabellen 1-13). Mit Ausnahme des Madribon-Stabilisators ergab sich bei keinem der Stoffe eine signifikante Differenz als Folge der unterschiedlichen Belichtung.

Die homozygoten Tiere wurden zunächst mit Dosen injiziert, die etwa 75% der bei den heterozygoten Ratten ermittelten L.D.50 entsprachen. Je nach Verträglichkeit wurden später noch grössere oder kleinere Dosen zusätzlich getestet.

Bei dem Versuch der Interpretation der Differenzen der akuten Toxizität der verschiedenen Substanzen bei homo- und heterozygoten sowie bei bestrahlten und im Dunkeln gehaltenen Tieren scheint es ratsam, gleich die unterschiedliche Gewichtszunahme mit zu berücksichtigen.

Die Gewichtszunahme der Rattenjungen hängt von vielen Faktoren ab, wie z.B. der Laktationsfähigkeit der Mutter, der Anzahl der von einer Mutter gesäugten Jungen oder geringen Variationen in der Alterszusammensetzung der Jungen. Wegen der Schwierigkeiten bei der Zucht von Gunn-Ratten mußten einige derartige Störfaktoren in Kauf genommen werden. Demzufolge ist die Streubreite der Gewichtszunahme relativ groß. Das muß bei der Auswertung bedacht werden.

In den folgenden Tabellen findet sich die durchschnittliche Gewichtszunahme und Standardabweichung bei hetero- und homozygoten Tieren, bestrahlt und unbestrahlt, nach Injektion der verschiedenen Präparate. Die L.D.50 wurde hier mit einem Pfeil markiert, findet sich jedoch auch gesondert aufgeführt in Tabelle 1.

Von den ungespritzten heterozygoten Kontrolltieren (Tabelle 2) überlebten unter dem Licht nur unwesentlich mehr Tiere als im Dunkeln. Jedoch zeigt sich bei der Gewichtszunahme beider Gruppen ein geringer Unterschied zu Ungunsten der im Licht gehaltenen Tiere.

tenen Tiere. Dies mag durch die Irritation der Mütter und der Rattenbabies durch die kontinuierliche Bestrahlung bedingt sein. Die ungespritzten homozygoten Kontrolltiere (Tabelle 2) nehmen insgesamt etwas besser zu als die heterozygoten Kontrolltiere. Dabei ist kein wesentlicher Unterschied zwischen bestrahlter und unbestrahlter Gruppe feststellbar. Dennoch liegt die Überlebensrate bei den unbestrahlten Tieren deutlich unter der der vergleichbaren heterozygoten Gruppe. Hier wirkt sich die ausgeprägte Hyperbilirubinämie der homozygoten unbestrahlten Ratten deutlich negativ auf die Überlebensrate aus. Auffallend ist die Senkung der Letalität durch die Phototherapie: Nach 4-tägiger Beobachtungszeit überleben nur 65% der unbestrahlten, aber 88% der bestrahlten Tiere.

Tabelle 2

4-Tage-Überlebensrate und Gewichtszunahme bei hetero- und homozygoten Gunn-Ratten ohne Injektion (Kontrolltiere). A: Anzahl der getesteten Tiere bei Versuchsbeginn. B: Anzahl der Tiere nach Beendigung des Versuches. C: Durchschnittliche Gewichtszunahme und Standardabweichung in Gramm.

Heterozygot

	unbestrahlt			bestrahlt		
	A	B	C	A	B	C
Überlebende	52	45	4,60 [±] 2,61	53	48	4,19 [±] 2,19
		86,5%			90,6%	
<u>Homozygot</u>						
Überlebende	43	28	5,46 [±] 2,65	43	38	5,35 [±] 2,29
		65%			88%	

Bei Refobacin 10mg (Tabelle 3) zeigt sich deutlich ein Unterschied in der Verträglichkeit der verschiedenen Dosen für homo- und heterozygote Tiere. Heterozygote Tiere vertragen etwa das 3-fache der Dosis, die homozygote Tiere vertragen. Dies dürfte bedingt sein durch den hohen Anteil an Benzylalkohol in der Ampullenlösung. Dabei überleben bestrahlte homozygote Tiere eine geringfügig höhere Dosierung als die unbestrahlten. Bei den

heterozygoten Tieren hingegen bleibt die Bestrahlung ohne Einfluß. (In Abb. 21 auf S.31 ist hierzu noch ein besonderes Schaubild gezeichnet.) Bei fast allen Versuchen mit diesem Präparat zeigte sich, daß sich die Gewichtszunahme der Tiere bei steigenden Dosen vermindert.

Tabelle 3

4-Tage-Überlebensrate und Gewichtszunahme bei hetero- und homozygoten Gunn-Ratten nach Injektion von Refobacin 10mg. A: Anzahl der getesteten Tiere bei Versuchsbeginn. B: Anzahl der Tiere nach Beendigung des Versuches. C: Durchschnittliche Gewichtszunahme und Standardabweichung in Gramm.

Heterozygot

	unbestrahlt			bestrahlt		
Dosis(STAB II)	A	B	C	A	B	C
200mg/kg(0,04ml/g)	10	10	3,90 [±] 2,11	5	0	-
300mg/kg(0,06ml/g)	13	11	2,86 [±] 1,71	10	10	2,15 [±] 1,69
350mg/kg(0,07ml/g)	→ 10	7	2,97 [±] 1,54	→ 5	5	1,23 [±] 0,13
400mg/kg(0,08ml/g)	8	0	-	→ 4	0	-
500mg/kg(0,10ml/g)	12	0	-	6	0	-
600mg/kg(0,12ml/g)	9	0	-			
700mg/kg(0,14ml/g)	3	0	-			

Homozygot

100mg/kg(0,02ml/g)	→ 8	6	4,35 [±] 0,45	6	6	4,19 [±] 2,66
200mg/kg(0,04ml/g)	8	0	-	→ 9	2	-2,00

Refobacin L und Refobacin 40mg (Tabelle 4) können auf Grund der ähnlichen Ergebnisse gemeinsam abgehandelt werden. Bei den beiden Präparaten liegt die L.D.50 für unbestrahlte heterozygote Tiere sehr nahe beisammen. Als Ursache für die etwas niedrigere L.D.50 von Refobacin 40mg kann der im Präparat enthaltene Stabilisator angesehen werden. Da jedoch in 1ml Refobacin 40mg im Vergleich zu Refobacin 10mg nur ein Achtel der Menge an Benzylalkohol enthalten ist, tritt die toxische Wirkung erst bei wesentlich höheren Dosen auf. Bei den homozygoten Tieren wurde mit Injektionen bis 400mg/kg bei Refobacin L wie bei Refobacin

Tabelle 4

4-Tage-Überlebensrate und Gewichtszunahme bei hetero- und homozygoten Gunn-Ratten nach Injektion von Refobacin 40mg und Refo-bacin L. A: Anzahl der getesteten Tiere bei Versuchsbeginn.

B: Anzahl der Tiere nach Beendigung des Versuches. C: Durchschnittliche Gewichtszunahme und Standardabweichung in Gramm.

REFOBACIN 40mg (STAB III)

Heterozygot

Dosis (STAB III)	unbestrahlt			bestrahlt		
	A	B	C	A	B	C
500mg/kg(0,0125ml/g)	12	12	2,77 [±] 1,52			
600mg/kg(0,015ml/g)	15	12	3,47 [±] 1,73			
650mg/kg(0,0163ml/g)	→10	4	5,46 [±] 1,64			
700mg/kg(0,0175ml/g)	8	3	1,27			
800mg/kg(0,020ml/g)	3	0	-			

Homozygot

200mg/kg(0,005ml/g)	14	14	3,78 [±] 0,91	6	6	5,15 [±] 0,50
300mg/kg(0,0075ml/g)	3	3	2,00	3	3	2,67
400mg/kg(0,010ml/g)	→10	7	4,84 [±] 1,40	→8	6	3,28 [±] 3,03

REFOBACIN L

Heterozygot

500mg/kg	2	2	6,57
650mg/kg	→26	20	6,83 [±] 1,67
800mg/kg	→4	0	-

Homozygot

200mg/kg	11	10	3,12 [±] 0,98	10	10	4,77 [±] 1,24
300mg/kg	3	3	2,64	3	3	2,45
400mg/kg	↓2	2	4,59	↓2	2	1,34

40mg die L.D.50 nicht erreicht, gleichgültig, ob die Tiere bestrahlt oder im Dunkeln gehalten wurden. Eine sichere Abhängigkeit der Gewichtszunahme von der Dosis läßt sich bei beiden Präparaten nicht nachweisen.

Bei STAB III (Tabelle 5) fällt wie beim Refobacin 10mg die grose Differenz in der Verträglichkeit zwischen hetero- und homo-

zygoten Tieren auf. In der Tabelle 3 wurde bei Refobacin 10mg in Klammern jeweils die zugehörige Menge STAB II angegeben, die sich in den L.D.50-Werten weitgehend mit den für STAB III ermittelten deckt. Eine Ausnahme bilden die homozygoten bestrahlten Tieren, von denen mehr als 50% 0,04ml/g STAB III vertrugen, aber nur 2 von 9 eine analoge Dosis Refobacin 10mg. Ebenso wie beim Refobacin 10mg vermindert sich die Gewichtszunahme der Tiere mit steigenden Dosen STAB III.

Tabelle 5

4-Tage-Überlebensrate und Gewichtszunahme bei hetero- und homozygoten Gunn-Ratten nach Injektion von STAB III. A: Anzahl der getesteten Tiere bei Versuchsbeginn. B: Anzahl der Tiere nach Beendigung des Versuches. C: Durchschnittliche Gewichtszunahme und Standardabweichung in Gramm.

Heterozygot

Dosis	unbestrahlt			bestrahlt		
	A	B	C	A	B	C
0,01ml/g	3	3	3,91			
0,02ml/g	3	3	5,22			
0,03ml/g	4	4	3,66 [±] 1,25			
0,04ml/g	4	4	4,19 [±] 0,65			
0,05ml/g	7	7	2,52 [±] 1,74			
0,06ml/g	14	11	3,86 [±] 2,07	11	8	4,00 [±] 2,10
0,07ml/g	→15	7	1,13 [±] 2,74	→13	5	-2,39 [±] 1,15
0,08ml/g	11	2	-2,16	8	0	-

Homozygot

0,02ml/g	→19	11	5,04 [±] 2,36	6	5	5,05 [±] 3,38
0,04ml/g	13	1	-3,94	↓6	5	-1,05 [±] 2,16

Benzylalkohol (Tabelle 6) wurde in derselben Konzentration (10mg/ml) injiziert, in der er in STAB II und STAB III enthalten ist. Die L.D.50-Werte bei den bestrahlten und unbestrahlten heterozygoten und homozygoten Tieren entsprechen den bei STAB III und Refobacin 10mg gefundenen Werten. Auch hier zeigt sich die günstige Wirkung der Phototherapie durch Erhöhung der L.D.50 bei

den jj-Tieren. Die Übereinstimmung von Refobacin 10mg, STAB III und Benzylalkohol wird im Schaubild Abbildung 21 (s.S. 31) besonders klar. In der Tabelle 6 läßt sich eine Abhängigkeit der Gewichtszunahme von den injizierten Dosen auch für Benzylalkohol nachweisen.

Tabelle 6

4-Tage-Überlebensrate und Gewichtszunahme bei hetero- und homozygoten Gunn-Ratten nach Injektion von Benzylalkohol. A: Anzahl der getesteten Tiere bei Versuchsbeginn. B: Anzahl der Tiere nach Beendigung des Versuches. C: Durchschnittliche Gewichtszunahme und Standardabweichung in Gramm.

Heterozygot

Dosis	unbestrahlt			bestrahlt		
	A	B	C	A	B	C
0,04ml/g	2	2	6,39			
0,05ml/g	2	2	6,67			
0,06ml/g	17	13	1,75 [±] 3,41	12	6	1,81 [±] 2,26
0,07ml/g	→ 15	6	3,38 [±] 3,35	12	4	-0,14 [±] 1,67
0,08ml/g	16	2	-0,26	12	2	0,60

Homozygot

0,02ml/g	→ 8	6	4,26 [±] 1,61	5	5	4,06 [±] 0,23
0,04ml/g	13	0	-	→ 6	4	1,98 [±] 0,77

Titriplex = Na₂-EDTA wurde nur bei den unbestrahlten homozygoten Tieren in einer Dosierung von 0,04ml/g getestet. Alle Tiere vertrugen diese Menge ohne Schaden. (Tabelle 7)

Tabelle 7

4-Tage-Überlebensrate und Gewichtszunahme bei homozygoten, unbestrahlten Gunn-Ratten nach Injektion von 0,04ml/g Na₂-EDTA.

A: Anzahl der getesteten Tiere bei Versuchsbeginn. B: Anzahl der Tiere nach Beendigung des Versuches. C: Durchschnittliche Gewichtszunahme und Standardabweichung in Gramm.

Dosis	A	B	C
0,04ml/g	8	8	3,68 [±] 1,44

Im Folgenden werden die Stabilisatoren besprochen, bei denen keine Konkurrenz mit dem Bilirubin um dessen Bindungsstelle am Albuminmolekül zu erkennen war.

Der Stabilisator des Gramaxins (Tabelle 8) enthält als einzigen Bestandteil das Lokalanästhetikum HCl-Lidocain. Von heterozygoten Tieren wird er geringfügig besser vertragen als von homozygoten, wobei in beiden Gruppen die L.D.50 der unbestrahlten Tiere unwesentlich unter der der bestrahlten liegt. Die Gewichtszunahme nach der Injektion verschiedener Dosen schwankt erheblich; Gesetzmäßigkeiten lassen sich nicht finden.

Tabelle 8

4-Tage-Überlebensrate und Gewichtszunahme bei hetero- und homozygoten Gunn-Ratten nach Injektion von STAB-Gramaxin. A: Anzahl der getesteten Tiere bei Versuchsbeginn. B: Anzahl der Tiere nach Beendigung des Versuches. C: Durchschnittliche Gewichtszunahme und Standardabweichung in Gramm.

Heterozygot

Dosis	unbestrahlt			bestrahlt		
	A	B	C	A	B	C
0,01ml/g	4	4	4,29 [±] 2,00			
0,015ml/g	5	5	2,88 [±] 1,93			
0,020ml/g				6	6	2,11 [±] 0,84
0,025ml/g	33	22	5,47 [±] 2,18			
0,03ml/g	→			11	9	1,56 [±] 2,45
0,04ml/g	15	0	-	→ 8	3	5,87

Homozygot

0,01ml/g	13	10	3,58 [±] 1,36	6	6	5,08 [±] 0,57
0,02ml/g	→ 19	17	4,66 [±] 1,36	13	10	1,67 [±] 1,38
0,03ml/g	9	4	2,75 [±] 0,86	→ 10	5	5,88 [±] 2,71
0,04ml/g	3	0	-	3	1	7,06

Beim Stabilisator des Madribons (Tabelle 9) fiel - unerwartet - die L.D.50 bei bestrahlten homo- und heterozygoten Tieren auf weniger als die Hälfte der L.D.50 unbestrahlter Tiere ab. Mit Hilfe zusätzlicher Versuche mit Tris-Puffer (dem Stabilisator

in Metalcaptase/Dissertation STEFFEN) konnte dieser Befund geklärt werden. Sowohl STAB-Madribon als auch Tris-Puffer, erzeugen nach subcutaner Injektion großflächige Hautinfiltrate auf dem Rücken der Ratten, die mit einer Verbrennung 2. bis 3. Grades verglichen werden können. (Als Ursache der sich entwickelnden Nekrosen kommt beim STAB-Madribon der hohe Gehalt an NaOH in Frage, der den pH-Wert stark zur alkalischen Seite verschiebt.) Die Ausdehnung der Hautinfiltrate und Nekrosen wurde offenbar vom Licht begünstigt. Die Tiere wurden exsikkotisch. Die geringe Gewichtszunahme der Bestrahlten gegenüber den Unbestrahlten bei gleicher Dosis unterstreicht diese Tatsache.

Tabelle 9

4-Tage-Überlebensrate und Gewichtszunahme bei hetero- und homozygoten Gunn-Ratten nach Injektion von STAB-Madribon. A: Anzahl der getesteten Tiere bei Versuchsbeginn. B: Anzahl der Tiere nach Beendigung des Versuches. C: Durchschnittliche Gewichtszunahme und Standardabweichung in Gramm.

Heterozygot

Dosis	unbestrahlt			bestrahlt		
	A	B	C	A	B	C
0,005ml/g	4	4	$4,23 \pm 1,70 \rightarrow$			
0,010ml/g	$\rightarrow 20$	15	$4,14 \pm 1,62$	12	4	$-0,55 \pm 0,66$
0,20ml/g	29	1	-0,42	12	0	-
0,03ml/g				6	0	-
0,04ml/g	9	0	-			

Homozygot

0,006ml/g	3	2	$5,17 \rightarrow$			
0,010ml/g	$\rightarrow 19$	11	$2,59 \pm 2,14$	16	5	$0,62 \pm 1,50$
0,020ml/g	18	5	$4,31 \pm 1,22$			

STAB-Gantrisin (Tabelle 10) wurde von allen Tieren, ob hetero- oder homozygot, ob bestrahlt oder unbestrahlt, gleich gut vertragen. Auch bei Injektionen von 0,06ml/g ließ sich die L.D.50 nicht erreichen. Die Gewichtszunahme schwankte bei allen Gruppen stark, so daß sie sich mit der Dosierung nicht in Bezug

bringen ließ.

Tabelle 10

4-Tage-Überlebensrate und Gewichtszunahme bei hetero- und homozygoten Gunn-Ratten nach Injektion von STAB-Gantrisin. A: Anzahl der getesteten Tiere bei Versuchsbeginn. B: Anzahl der Tiere nach Beendigung des Versuches. C: Durchschnittliche Gewichtszunahme und Standardabweichung in Gramm.

Heterozygot

Dosis	unbestrahlt			bestrahlt		
	A	B	C	A	B	C
0,04ml/g	9	9	5,48 [±] 0,77			
0,05ml/g	6	6	3,23 [±] 0,36	6	6	2,63 [±] 1,22
0,06ml/g	12	11	5,63 [±] 1,27	12	12	5,08 [±] 1,37

Homozygot

0,0075ml/g	3	3	4,59			
0,02ml/g	4	4	3,85 [±] 0,83	4	4	4,74 [±] 0,95
0,04ml/g	18	18	4,57 [±] 1,91	15	13	3,33 [±] 0,75
0,05ml/g	12	12	4,82 [±] 1,79	12	11	4,50 [±] 1,32
0,06ml/g	12	12	2,75 [±] 1,85	12	12	3,08 [±] 1,46

Dimethylacetamid (Tabelle 11) ist neben Benzylalkohol und Nicotinamid ein Bestandteil des Novobiocin-Stabilisators. Er wurde den Tieren in einer 10%-igen Lösung injiziert. Die L.D.50 betrug für unbestrahlte hetero- und homozygote Tiere 0,018ml/g, während 5 bestrahlte homozygote Tiere die Injektion von 0,02ml/g überlebten. Allerdings haben diese Tiere in den 4 folgenden Tagen nicht an Gewicht zugenommen, so daß sich die L.D.50 der bestrahlten homozygoten Tiere nicht allzusehr von der der unbestrahlten Tiere unterscheiden dürfte.

STAB-Novobiocin (Tabelle 12) weist für hetero- und homozygote, bestrahlte und unbestrahlte Tiere diesselben L.D.50-Werte zwischen 0,01 und 0,02ml/g auf. Sie liegt erheblich unter den L.D.50-Werten der einzelnen getesteten Komponenten des Lösungsvermittlers. Besonders sei hier darauf verwiesen, daß Dimethyl-

Tabelle 11

4-Tage-Überlebensrate und Gewichtszunahme bei hetero- und homozygoten Gunn-Ratten nach Injektion von Dimethylacetamid. A: Anzahl der getesteten Tiere bei Versuchsbeginn. B: Anzahl der Tiere nach Beendigung des Versuches. C: Durchschnittliche Gewichtszunahme und Standardabweichung in Gramm.

Heterozygot

Dosis	unbestrahlt			bestrahlt		
	A	B	C	A	B	C
0,01ml/g	8	8	4,17 $\pm$ 1,52			
0,02ml/g	→11	8	-2,40 $\pm$ 2,40			
0,03ml/g	3	0	-			
0,04ml/g	6	0	-			
0,06ml/g	3	0	-			
<u>Homozygot</u>						
0,01ml/g	9	9	1,89 $\pm$ 1,75	5	5	0,30 $\pm$ 1,12
0,02ml/g	→14	5	1,45 $\pm$ 1,69	↓5	5	-0,80 $\pm$ 1,84
0,04ml/g	4	0	-			

Tabelle 12

4-Tage-Überlebensrate und Gewichtszunahme bei hetero- und homozygoten Gunn-Ratten nach Injektion von STAB-Novobiocin. A: Anzahl der getesteten Tiere bei Versuchsbeginn. B: Anzahl der Tiere nach Beendigung des Versuches. C: Durchschnittliche Gewichtszunahme und Standardabweichung in Gramm.

Heterozygot

Dosis	unbestrahlt			bestrahlt		
	A	B	C	A	B	C
0,01ml/g	→4	4	3,43 $\pm$ 1,41			
0,02ml/g	4	1	2,95			
0,03ml/g	4	0	-			
<u>Homozygot</u>						
0,01ml/g	→12	12	3,14 $\pm$ 1,26	→6	6	0,90 $\pm$ 1,81
0,02ml/g	9	0	-	4	0	-
0,04ml/g	9	0	-	5	0	-

acetamid im STAB-Novobiocin nur in 10-fach geringerer Dosierung enthalten ist, als er von uns isoliert getestet wurde. Da die L.D.50 von Nicotinamid in der Literatur mit 1,7g/kg (Ratte s.c., Merck-Index) angegeben wird, kommt kein einzelner Bestandteil allein für die schädliche Wirkung des Stabilisators in Frage. Die Erhöhung der Toxizität über die jedes Einzelbestandteiles hinaus scheint vielmehr eine Folge des Zusammenwirkens aller oder einzelner Komponenten des Stabilisators zu sein.

Novobiocin mit und ohne Stabilisator (Tabelle 13) weist gleichartige L.D.50-Werte auf. Die negative Wirkung des Stabilisators kann wegen der geringen Konzentration in der Injektionslösung praktisch unberücksichtigt bleiben. Bei den homozygoten Tieren wurde nicht mehr als 100mg/kg gespritzt und damit die L.D.50 nicht erreicht. Bei der Gewichtszunahme der heterozygoten Tiere erkennt man eine Verringerung des Gewichtsansatzes bei steigenden Dosen.

Tabelle 13

4-Tage-Überlebensrate und Gewichtszunahme bei hetero- und homozygoten Gunn-Ratten nach Injektion von Novobiocin mit und ohne Stabilisator. A: Anzahl der getesteten Tiere bei Versuchsbeginn. B: Anzahl der Tiere nach Beendigung des Versuches. C: Durchschnittliche Gewichtszunahme und Standardabweichung in Gramm.

NOVOBIOCIN MIT STAB

Heterozygot

Dosis	unbestrahlt			bestrahlt		
	A	B	C	A	B	C
100mg/kg(0,001ml/g)	8	8	4,19 [±] 1,47			
150mg/kg(0,0015ml/g)	4	4	5,12 [±] 1,25			
200mg/kg(0,002ml/g)	4	4	3,78 [±] 1,72			
300mg/kg(0,003ml/g)	→ 4	0	-			
500mg/kg(0,005ml/g)	6	0	-			

Homozygot

100mg/kg(0,001ml/g)	↓ 10	9	4,69 [±] 2,47	↓ 5	5	2,03 [±] 1,92
---------------------	------	---	------------------------	-----	---	------------------------

Tabelle 13 (Fortsetzung)

NOVOBIOCIN OHNE STAB

Heterozygot

Dosis	unbestrahlt			bestrahlt		
	A	B	C	A	B	C
100mg/kg	10	10	5,76 ^{+1,26}			
150mg/kg	4	4	6,88 ^{+0,61}			
200mg/kg	8	7	4,66 ^{+1,29}			
250mg/kg	→ 4	4	2,87 ^{+1,17}			
300mg/kg	12	4	1,37 ^{+2,03}			
500mg/kg	8	0	-			
<u>Homozygot</u>						
10mg/kg	3	3	4,07			
100mg/kg	↓ 14	14	3,14 ^{+2,04}	↓ 10	10	3,65 ^{+0,82}

4. DISKUSSION

Für die Erforschung des Einflusses von Medikamenten und/oder deren Hilfslösungen auf die Bilirubin-Albumin-Bindung eignet sich für in-vivo-Versuche ganz besonders die homozygote Gunn-Ratte, die an einem angeborenen Glucuronyltransferase-Mangel leidet und damit Zeit Lebens eine nicht konjugierte Gelbsucht hat.

An Hand von Vergleichen der Serum-Bilirubinwerte vor und nach Injektion eines Präparates läßt sich feststellen, ob der entsprechende Stoff das Bilirubin aus seiner Albuminbindung verdrängt oder nicht. Das Tiermodell führt auf Grund der relativ einfach durchzuführenden Messungen zu übersichtlichen und aussagekräftigen Ergebnissen.

Allerdings muß man einige Besonderheiten der Gunn-Ratte beachten, um die Ergebnisse der Tierversuche mit den durch andere Techniken und Methoden erhaltenen vergleichen zu können. So läßt sich z.B. eine Konkurrenz der injizierten Präparate um die Glucuronyltransferase in der Leber an der Gunn-Ratte nicht testen. Zu beachten ist ferner die Abhängigkeit der Höhe des Serum-Bilirubins vom Ernährungszustand der Rattenbabies, d.h. unter anderem von der Laktationsfähigkeit der Mutter und der Anzahl der gesäugten Jungen. Wir bemühten uns, derartige Varianzen dadurch gering zu halten, daß keine Mutter mehr als 7 Junge zum Säugen bekam. Trotzdem ließen sich wegen der generellen Schwierigkeit der Zucht von Gunn-Ratten bei einzelnen Versuchsreihen gewisse Unterschiede im Ausgangsgewicht und Ausgangsbilirubin nicht ganz vermeiden.

Zu Versuchsbeginn wurde den Tieren eine einzelne relativ große Dosis des zu untersuchenden Präparates injiziert. Mehrere kleinere, über die Versuchsdauer von 4 Tagen hinweg verabreichte Dosen, hätten zur Folge gehabt, daß die bestrahlten und die unbestrahlten Tiere bei den späteren Injektionen einen durch die Phototherapie beeinflussten, unterschiedlich hohen Bilirubingehalt aufgewiesen hätten. Die mit diesen hohen Dosen beobachte-

ten Veränderungen lassen sich sicherlich nicht ohne weiteres auf klinische Situationen beim Menschen übertragen.

Immerhin muß man davon ausgehen, daß z.B. ein ikterisches Frühgeborenes, das an einer Sepsis leidet, verschiedene Präparate erhält, von denen z.T. noch nicht bekannt ist, ob und wie intensiv sie mit dem Bilirubin um die Albuminbindung konkurrieren. Man muß damit rechnen, daß sich der verdrängende Effekt verschiedener Medikamente addiert. Damit erhöht sich aber die Gefahr der Entstehung eines Kernikterus wesentlich. Als Säuglingsdosis sind etwa folgende Mengen anzusehen: Sulfisoxazol (Gantrisin) 0,2g/kg/d, Sulfadimethoxin (Madribon) 0,02g/kg/d, Gentamicin(Refobacin) 5-6mg/kg/d, Novobiocin (Albamycin) 15mg/kg/d. (Sulfonamide werden ikterischen Neugeborenen, Novobiocin Säuglingen überhaupt nicht mehr verordnet.)

Eine Arbeitsgruppe um JOHNSON in Philadelphia (JOHNSON et al., 1,2) beschäftigte sich mit den Möglichkeiten, die sich aus Versuchen mit der Gunn-Ratte ergeben. Die für uns wichtigen Ergebnisse sollen im Folgenden diskutiert und den unsrigen gegenübergestellt werden.

Die von JOHNSON gemessenen Hämatokritwerte junger Tiere unterscheiden sich praktisch nicht von denen, die wir nach der ersten Blutentnahme erhalten haben. Bei den erwachsenen Tieren kann JOHNSON, entsprechend unseren Meßergebnissen bei jungen Ratten, keinen Zusammenhang zwischen Serum-Bilirubin- und Hämatokritwerten herstellen.

In der 1959 veröffentlichten Arbeit untersuchten die genannten Autoren zwei Sulfonamide, das Sulfisoxazol (Gantrisin) und Sulfadiazin hinsichtlich ihrer Wirkung auf den Serum-Bilirubin-gehalt der Gunn-Ratte. Sie fanden bei den mit diesen Präparaten behandelten Tieren eine erhöhte Sterblichkeit im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrollgruppe und konnten damit die Beobachtung SILVERMAN's (SILVERMAN et al., 3) über das Gantrisin aus dem Jahre 1956 im Tierversuch reproduzieren. Außerdem haben sie den auch von uns gefundenen Bilirubinabfall nach Ga-

be dieser Sulfonamide beschrieben.

1961 verfolgten sie die These, daß insbesondere organische Anionen mit dem Bilirubin um dessen Albuminbindung konkurrieren. Unter anderem testeten sie an jungen Tieren Na-Sulfadimethoxin (Madribon) und Na-Salicylat, außerdem noch einmal Na-Sulfadiazin und Na-Sulfisoxazol (Gantrisin). Nahezu alle Tiere, die mit diesen Präparaten behandelt wurden, entwickelten einen in-vivo an neurologischen Symptomen erkennbaren Kernikterus, gleichartige Symptome traten nur bei etwa 50% der unbehandelten Kontrolltiere auf. Fast alle injizierten Tiere verstarben an dem Kernikterus, gegenüber nur 22% in der Kontrollgruppe.

Ein Absinken des Serum-Bilirubins ließ sich nach Injektion aller Sulfonamide feststellen: Am stärksten bei Sulfadimethoxin (um 90% des Ausgangswertes), gefolgt von Sulfisoxazol (um 50%) und Sulfadiazin (um 30%). Die injizierten Dosen lagen bei ca. 200mg/kg.

Interessant erscheint in diesem Zusammenhang bei den 3 Präparaten ein Vergleich des Anteiles an freiem Sulfonamid gegenüber dem eiweißgebundenen im Serum (WALTER, HEILMEYER, 30) : Bei einer Sulfonamidkonzentration von 10mg% liegen beim Sulfadimethoxin 3,3%, beim Sulfisoxazol 18% und beim Sulfadiazin 58% frei im Serum vor. Vergleicht man diese Werte mit dem jeweils verursachten Bilirubinabfall, so ergibt sich, daß eine hohe Eiweißbindung (=geringer Anteil an freiem Sulfonamid) zu einer starken Bilirubin-Albumin-Dissoziation führt, bzw. eine geringe Eiweißbindung zu einer nur geringen Dissoziation.

Mit JOHNSON und YEARY und Mitarbeitern (YEARY, 4) kann man den Bilirubinabfall, der durch Medikamente und/oder deren Hilfslösungen hervorgerufen wird, folgendermaßen deuten: Durch die Konkurrenz der Präparate um die Bindungsstelle des Bilirubins am Albuminmolekül wird das Bilirubin teilweise aus seiner Bindung verdrängt und gelangt als freier, ungebundener Farbstoff in das Serum. Die Löslichkeit für Bilirubin in wässrigem Milieu ist jedoch sehr schlecht, so daß der Farbstoff in lipophile

Gewebe - so z.B. das ZNS - abwandert. Damit aber sinkt im Serum der Gesamt-Bilirubinspiegel. Die durch die Sulfonamide im in-vivo-Versuch an der Gunn-Ratte hervorgerufenen Bilirubinsenkungen lassen sich also mit diesem Mechanismus erklären. Außerdem wird die Gefahr für das ZNS deutlich, die hinter diesem Serum-Bilirubinabfall steht und der streng zu unterscheiden ist von dem Bilirubinabfall nach Phototherapie.

Im Jahr 1969 veröffentlichten SCHUTTA und JOHNSON (SCHUTTA, JOHNSON, 7) eine Arbeit über die klinischen Zeichen und neurologischen Abnormalitäten bei Gunn-Ratten. Mit diesen Arbeiten konnten sie die geäußerten Bedenken gegen die Anwendung von Sulfadimethoxin im frühen Kindesalter im Tierversuch überzeugend belegen. Besonders bis zu zwei Tage, jedoch auch bis zu drei Wochen alte Gunn-Ratten zeigten auffallende klinische Zeichen des Kernikterus, und die Gehirnschnitte der Tiere bewiesen durch intensive Gelbfärbung der Stammhirnganglien und eine spezifische Schädigung der Purkinje-Zellen des Kleinhirns die Abwanderung des Bilirubins aus dem Serum in das ZNS als lipophiles Gewebe.

Mit ihren Arbeiten über "Die Bindung der Antibiotika an die Eiweißkörper des Serums" versuchten SCHOLTAN und SCHMID (SCHOLTAN, SCHMID, 6,7) allgemeine Gesetzmäßigkeiten bei der Eiweißbindung zahlreicher Antibiotika herauszufinden. Diese wurden in drei Gruppen aufgeteilt: 1. Anionen, 2. Kationen und 3. neutrale Moleküle. Sie wurden mit Hilfe der Dialysemethode untersucht. Es zeigte sich, daß für die Eiweißbindung weder eine ionogene noch eine Wasserstoffbrückenbindung ausschlaggebend ist. Entscheidend scheinen für die Eiweißbindung der Antibiotika vielmehr die hydrophoben Gruppen, d.h. besonders die aromatischen Kerne eines Moleküls zu sein.

Man stellt sich zwei in der Tertiärstruktur des Albuminmoleküls gegenüberliegende aromatische Aminosäurereste (z.B. Phenylalanin, Tyrosin oder Tryptophan) vor, zwischen die sich die hydrophobe Gruppe des Antibiotikums einschiebt. Die sich nun gegenüberliegenden Molekülreste haben eine starke Bindungskraft zu-

einander, die durch die hydrophobe Bindung und van-der-Waal'schen Kräfte bedingt ist.

Mit dieser Theorie lässt sich das Bindungsvermögen der Sulfonamide an die Serumeiweißkörper gut erklären, da das Sulfonamidgerüst als Sulfanilamid einen Benzolring im Molekül trägt, der für den hydrophoben bzw. lipophilen Charakter des Moleküls verantwortlich ist. Die Stärke der hydrophoben Bindung ist abhängig von den Nebengruppen. Ein Benzolring mit vielen hydrophoben Nebengruppen wird insgesamt lipophiler sein als ein Benzolring mit wenigen oder gar keinen Nebengruppen. Auf diese Weise lassen sich die Unterschiede in der Stärke der Proteinbindung bei den einzelnen Sulfonamiden erklären.

Unter allen von SCHMID und SCHOLTAN untersuchten Antibiotika weist das auch von uns untersuchte Novobiocin auf Grund dreier aromatischer Ringe im Molekülgerüst die stärkste Eiweißbindung im Serum auf. 95% liegen in gebundener Form im Serum vor, nur 5% in freier Form. Zu ganz ähnlichen Ergebnissen gelangten auch FINLAND und NICHOLS (FINLAND, NICHOLS, 8) und MALAKA-ZAFIRIU (MALAKA-ZAFIRIU, 9).

Nach diesen Ergebnissen lag die Vermutung nahe, daß Novobiocin das Bilirubin massiv verdrängen und somit bei der Gunn-Ratte einen deutlich nachweisbaren Serum-Bilirubinabfall zur Folge haben müsse. Dies hat sich jedoch in den von mir durchgeführten Versuchen nicht bestätigt. Auch von anderen Untersuchern liegen Berichte vor, wonach bei ikterischen Neugeborenen das Serum-Bilirubin nach Applikation von Novobiocin stark ansteigt. SUTHERLAND (SUTHERLAND et al., 10) behandelte 1959 nach Auftreten einer schweren Staphylokokkeninfektion auf einer Neugeborenenstation die Kinder mit Novobiocin (150mg/d) und fand eine epidemisch auftretende Hyperbilirubinämie. Er stellte daraufhin Versuche mit neugeborenen Ratten an, denen er Novobiocin in Dosen von 100-400mg/kg injizierte. Dabei verfärbte sich die Haut der Tiere gelb, wenn auch nicht so stark wie bei den Neugeborenen. Das gepoolte Serum der Ratten zeigte bei steigenden Novobiocin-Dosen einen proportional bis ca. 2,5mg% ansteigendes Serum-Bilirubin.

Ein Absinken der Bilirubin-Ausscheidungsgeschwindigkeit zeigte sich nach i.v.-Injektionen von ca. 25mg/kg Bilirubin bei Kaninchen nach Gabe von Novobiocin (50-250mg/kg). Auch GLEISS (GLEISS, 11) machte die Beobachtung, daß Novobiocin (Dosis 15mg/kg/d i.m.) bei unreifen Neugeborenen eine signifikante Erhöhung der Serum-Bilirubinwerte verursacht.

Welche patho-biochemischen Vorgänge liegen dieser Hyperbilirubinämie zu Grunde? HSIA und Mitarbeiter (HSIA et al., 12) untersuchten verschiedene Präparate, unter anderem auch Novobiocin, auf ihre Hemmung der Glucuronyltransferase in der Leber. In einer in-vivo-Studie verabreichten sie jungen Ratten eine Einzeldosis von 500mg/kg Novobiocin und maßen dann die Glucuronyltransferase-Aktivität. Dabei fanden sie nach zwei bis acht Stunden einen Aktivitätsabfall von über 50%. Nach 24 Stunden hatte sich die Aktivität wieder normalisiert. Nach Auftragen der Versuchsergebnisse ins Lineweaver-Burk-Diagramm ließ sich eine Hemmung der Glucuronyltransferase vom nicht-kompetitiven Typ durch das Novobiocin ablesen. Dies bedeutet, daß das Novobiocin die Glucuronyltransferase nicht durch Besetzen der Stelle hemmt, an der das Substrat katalysiert wird (und wo der Inhibitor durch erhöhte Substratkonzentration sonst zu verdrängen wäre). Wahrscheinlich wird die Enzymkonfiguration, d.h. die Tertiärstruktur durch Besetzen einer anderen Stelle am Enzym so verändert, daß die Reaktionsgeschwindigkeit herabgesetzt wird. Dies ist zu erkennen an der Erhöhung der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit im Lineweaver-Burk-Diagramm. HSIA (HSIA et al., 13) bestätigte dieses Ergebnis in einem weiteren in-vitro-Test.

Im Gegensatz zu neugeborenen Kindern leiden die homozygoten Gunn-Ratten an einem absoluten Mangel an Glucuronyltransferase. Der eben geschilderte Wirkungsmechanismus des Novobiocins kommt für die homozygote Gunn-Ratte nicht in Betracht. FRANZ, JÄHNCHEN und KRIEGLSTEIN (FRANZ et al., 32) untersuchten den Einfluß verschiedener Pharmaka auf das Bindungsvermögen einer Albuminlösung für Promazin und Chlorpromazin. Dabei fanden sie

daß nach Gabe mancher Substanzen wie insbesondere des Suramins (Bayer 205) der Anteil an freiem Promazin abfiel, d.h. eine erhöhte Bindung für diesen Stoff die Folge war. Suramin mit seiner hohen Eiweißbindung verdrängt zwar das Promazin aus seinen Bindungsstellen, schafft jedoch auch durch eine Strukturänderung des Albuminmoleküls im Sinne einer Auffaltung neue Bindungsstellen, so daß das Bindungsvermögen des Albumins für Promazin sogar noch ansteigt.

Ähnliche Mechanismen müssen für die Wirkung des Novobiocins auf die Bilirubin-Albuminbindung diskutiert werden. Bei unseren Versuchen könnte der leichte Bilirubinabfall nach 30 Minuten durch den primär verdrängenden Effekt des Novobiocins bedingt sein. Die Normalisierung der Bilirubinwerte ließe sich durch die Strukturänderung des Albumins mit folgender Zunahme an Bindungsstellen für das Bilirubin erklären. Eine diese These bestätigende Zunahme der Serumviskosität als Folge der Strukturänderung, d.h. der Auffaltung des Albuminmoleküls ließ sich jedoch nach Novobiocingabe nicht nachweisen (SCHOLTAN, 7).

Bei Neugeborenen, die ja nur unter einem relativen Mangel an Glucuronyltransferase leiden, muß man über den eben besprochenen Mechanismus hinaus noch die Hemmung dieses Enzyms durch Novobiocin berücksichtigen. Möglicherweise ist diese Hemmung für den außergewöhnlichen Anstieg des Serum-Bilirubins nach Novobiocin-Therapie mit verantwortlich, der durch SUTHERLAND und GLEISS beobachtet wurde.

Bei der Untersuchung des Gentamicins hat STERN (STERN, 15) im Gegensatz zu unseren Ergebnissen bei in-vitro-Versuchen einen Anstieg des freien Bilirubins festgestellt, was gleichbedeutend wäre mit einer Verdrängung des an Serum-Albumin gebundenen Bilirubins durch Gentamicin. STERN hat die Verschiebung der Spektralabsorptionskurve von ca. 460nm nach 420-440nm als Maß für den Anstieg des freien Bilirubins benützt. Die Methode wurde wegen der Überbewertung geringster Veränderungen der Spektralabsorptionskurve von YEARY und DAVIS (YEARY, DAVIS. 4) kritisiert. Geringe Geräte- und Ablesefehler sollen auf eine zu

starke Zu- bzw. Abnahme des ungebundenen Albumins schließen lassen. STERN hat als Gentamicinpräparat Garamycin verwendet, das als Stabilisatorzusatz Paraben, ein Benzolderivat in uns nicht bekannter Konzentration, enthält. Möglicherweise ist der Lösungsvermittler an der Absorptionsänderung beteiligt.

ODELL und Mitarbeiter dokumentierten 1974 die Bilirubin-verdrängende Eigenschaft des Gentamicins ausführlich (ODELL et al., 16). Bei ihren in-vitro-Tests, bei denen drei verschiedene Techniken angewendet wurden, wurde reines Gentamicin benützt. Bei in-vivo-Untersuchungen wurden größtenteils kommerzielle Gentamicinpräparate (mit Stabilisatorzusätzen?) verwendet. Außer der oben schon diskutierten Messung der Verschiebung der Absorptionsspektren mit Modellseren und Seren von ikterischen Neugeborenen wurde bei den in-vitro-Tests noch der Bilirubinanstieg in einer Mitochondrien-Suspension gemessen. Dabei fanden sich nach Zugabe von Gentamicin in einer Konzentration von 4-10 µg/ml 40-50% des Bilirubins in den isolierten Mitochondrien gegenüber 4% ohne Gentamicin. Auch diese Methode erwies sich bei den Untersuchungen von YEARY und DAVIS als nicht absolut sicher. Indomethacin z.B. ließ die Bilirubinkonzentration in den Mitochondrien stark ansteigen, verursachte jedoch im Serum der Gunn-Ratte keinen Bilirubinabfall, was gegen eine Bilirubin-Albumin-Dissoziation spricht.

Die in-vivo-Untersuchungen wurden von ODELL und Mitarbeitern z.T. an Gunn-Ratten durchgeführt, die mit therapeutischen Dosen Gentamicin behandelt wurden. Wie bei unseren Versuchen wurde nach 30 Minuten und zusätzlich noch nach einer Stunde Blut abgenommen und die Serum-Bilirubinkonzentration bestimmt. Dabei beobachtete ODELL einen kräftigen Abfall des Serum-Bilirubins nach 30 Minuten. Dieser Befund ist mit unseren Ergebnissen nicht in Einklang zu bringen. Die Zahl der von ODELL verwendeten Versuchstiere - 5 Tiere in 3 Versuchen - erscheint sehr klein. Bei dem zweiten in-vivo-Test wurde vier ikterischen Neugeborenen Gentamicin gespritzt und anschließend der Serum-Bilirubingehalt des Blutes untersucht. Ferner wurde die Bili-

rubin-Sättigung des Serum-Albumins mit dem Salicylat-Sättigungsindex bestimmt (ODELL et al., 17). Auch hier ließen die Untersuchungsergebnisse den Schluß zu, daß Gentamicin das Bilirubin aus der Albuminbindung verdrängt und folglich die Gefahr einer Bilirubinenzephalopathie erhöht. Wie oben erwähnt, wurde für diese Versuche kommerzielles Gentamicin verwendet, von dem nicht auszuschließen ist, daß Stabilisatoren für die beschriebene Wirkung verantwortlich sind. 1975 haben ODELL und Mitarbeiter in einem Kommentar darauf hingewiesen, daß sie die eigenen Ergebnisse aus dem Jahre 1972/73 z.T. bei Anwendung anderer Präparate nicht mehr reproduzieren konnten.

WINDORFER und Mitarbeiter (WINDORFER et al., 18,19) fanden bei in-vitro-Versuchen mit Hilfe der Sephadex-Gel-Filtrationsmethode keinen Hinweis auf eine Bilirubin-verdrängende Wirkung des Gentamicins, wobei offensichtlich das reine Antibiotikum ohne Zusätze verwendet wurde. Die Sephadex-Gel-Filtrationsmethode stellt derzeit wohl die sicherste Technik dar, das freie, ungebundene Bilirubin qualitativ und eventuell sogar quantitativ zu erfassen (YEARY, DAVIS, 4; BLONDHEIM et al., 20).

MALAKA-ZAFIRIU (MALAKA-ZAFIRIU et al., 21) untersuchte mittels der HBABA 2-(4-hydroxybenzeneazo)benzoesäure -Farbstoffbindungsmethode das Konkurrenzverhalten des Gentamicins mit dem Bilirubin um die Glucuronyltransferase in der Leber. Er konnte dabei keine signifikante Hemmung des Enzyms durch das Gentamicin feststellen. Faßt man diese Ergebnisse unter Berücksichtigung der methodischen Unsicherheiten zusammen, so kommt man zu dem Schluß, daß eine Konkurrenz des Gentamicins mit dem Bilirubin um seine Albuminbindungsselle mit großer Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden kann.

Über den Einfluß der vielen Handelpräparaten zugesetzten Hilfsstofflösungen gibt es bisher recht wenig klinische Kommentare. Immerhin diskutierte schon SILVERMAN (SILVERMAN et al., 3) in seiner Arbeit über das Sulfisoxazol, daß für den beobachteten Bilirubinabfall nach Gantrisingabe nicht nur das Sulfonamid,

sonden auch der Stabilisator des Präparates verantwortlich sein könnte. Wie unsere Versuche zeigten, kann dies bei diesem Medikament ausgeschlossen werden.

STERN und Mitarbeiter (STERN et al., 22) stellten 1971 fest, daß die durch das Valium injectabile hervorgerufene Bilirubinverdrängung nicht durch das Diazepam, den eigentlichen Wirkstoff, sondern durch den in der Lösung enthaltenen Lösungsvermittler verursacht wird. Weitere Arbeitsgruppen (WINDORFER, MIHAILOVA, 18; BALLOWITZ, HANFELD, 23) konnten diesen Sachverhalt bestätigen. Überprüft man die Zusammensetzung des Valium-injectabile-Stabilisators, der aus einem Gemisch von Propylenglykol, Äthylenglykol, Na-Benzolat, Benzoessäure und Benzylalkohol besteht, so fallen insbesondere die letzten drei Verbindungen auf, die einen Benzolring im Molekülgerüst tragen. Die oben erwähnten Untersuchungen STERN's (STERN et al., 22) ergaben nämlich auch, daß das früher in der Neugeborenen-therapie viel verwendete Coffein-Natriumbenzoat eine Bilirubinverdrängung verursacht. Bei getrennter Prüfung des Coffeins und des Na-Benzolats zeigte sich, daß das Na-Benzolat für den beobachteten Effekt verantwortlich zu machen ist. Eben dieses Na-Benzolat ist neben anderen Benzolderivaten auch im Valium-injectabile-Lösungsvermittler enthalten. Wie die schon weiter vorn angeführte Arbeit von SCHOLTAN (SCHOLTAN, 7) zeigte, scheinen für die Albuminbindung die lipophilen Gruppen eines Moleküls eine besonders wichtige Rolle zu spielen, da sie eine bedeutend stärkere Bindung an das Albumin bewirken, als das durch eine ionogene oder Wasserstoffbrückenbindung möglich wäre. Diese These wird gestützt durch die Beobachtung, daß die ebenfalls lipophilen Benzolderivate des Valium-injectabile-Stabilisators eine deutliche Verdrängung des Bilirubins vom Albumin verursachen. In die gleiche Richtung deuten unsere Beobachtungen mit den Refobacin- und Albamycin-Stabilisatoren sowie dem Benzylalkohol.

Über die anderen von uns untersuchten Stabilisatoren wie Dimethylacetamid, Na_2 -EDTA, Na-Pyrosulfit, Diäthanolamin (und

Nicotinamid), läßt sich in der Literatur kein Hinweis auf ein Konkurrenzverhalten gegenüber dem Serum-Albumin oder der Glucuronyltransferase in der Leber finden. Auch unsere Ergebnisse weisen daraufhin, daß sie eine solche Wirkung, zumindest bei der Gunn-Ratte, nicht entfalten.

Diäthanolamin ist eine starke Base (FIEDLER, 25) und schädigt bei äußerlicher Anwendung Haut und Schleimhäute (MERCK-INDEX, 26). Es hat emulgierende und dispergierende Wirkung und wird im pharmazeutischen Bereich zur pH-Einstellung verwendet.

Dimethylacetamid findet industriell in bis zu 90%-iger Konzentration als Lösungsvermittler Verwendung und wirkt in größeren Dosen halluzinogenisch (ANSCHER, 24). In der Stabilisatorlösung des Albamycins sind $0,47\text{cm}^3/\text{ml}$ in 10%-iger Konzentration enthalten. KREYBIG (KREYBIG, 27) gibt die L.D.50 (s.c., Ratte) mit ca. 3000mg/kg an.

HCl-Lidocain wurde dem geweber reizenden Cephazolin als Lokalanästheticum beigelegt. Es zeigt als Nebenwirkungen in hohen Dosen zentrale Lähmungen und negativ chronotrope, dromotrope und inotrope Wirkungen auf die Herzmuskulatur. Alle Erscheinungen einer Lidocain-Intoxication konnten wir bei unseren Versuchen nach einer Dosis von $0,04\text{ml/g}$ STAB-Gramaxin beobachten. Unmittelbar nach der Injektion atmeten die Tiere sehr schwer, waren schlaff, kühlten rasch aus und reagierten nicht mehr auf äußere Reize. Der Herzschlag war überaus langsam. Erst nach einigen Stunden erholten sich die Tiere wieder.

Über die L.D.50 bei Ratten nach s.c.-Injektion fand ich in der Literatur keine Angaben.

Nicotinamid (Vitamin B₃) ist ein essentielles Vitamin mit Anti-Pellagra-Wirkung. Als Lösungsmittel findet es außer bei Albamycin z.B. bei Menadion (Vitamin K) Verwendung. Die L.D.50 wird von STUDER (STUDER, 33) mit 3400mg/kg (s.c., Ratte) angegeben.

Na₂-EDTA (Titriplex) dient in Injektionslösungen als Stabili-

sator. Als Komplexbildner hemmt es die durch Metallionen katalysierte Autooxydation (FIEDLER, 25).

Na-Pyrosulfit wird auf Grund seines Reduktionsvermögens (MERCK-INDEX, 26) als Desinfektions- und Konservierungsmittel eingesetzt (FIEDLER, 25).

Benzylalkohol wirkt antiseptisch, lokal anästhetisch und findet in Injektionslösungen als Konservierungsmittel Anwendung (MERCK-INDEX, 26). In der Literatur läßt sich keine L.D.50 bei Ratten nach s.c.-Injektion finden.

Eine Liste mit der Zusammensetzung aller getesteter Stabilisatorlösungen findet sich in Tabelle 14.

Die Phototherapie kann sowohl beim neugeborenen Menschen als auch bei den jungen Gunn-Ratten die Auswirkungen einer Hyperbilirubinämie auf das ZNS vermindern bzw. verhüten. Dies läßt sich bei meinen Versuchen bereits eindrucksvoll an der niedrigeren Mortalitätsrate von bestrahlten gegenüber unbestrahlten homozygoten Kontrolltieren zeigen. Diese Tatsache ist nicht neu - zahlreiche Forschungsgruppen beschäftigten sich mit dem Effekt des Lichtes auf den Bilirubinmetabolismus.

OSTROW und BRANHAM (OSTROW, BRANHAM, 28) wiesen u.a. an der Gunn-Ratte nach, daß die bei der Photooxydation entstehenden wasserlöslichen Bilirubin-Abbauprodukte rasch mit der Galle und dem Urin ausgeschieden werden. Damit scheint eine erhöhte Exkretion indirekten Bilirubins in der Leber verbunden zu sein. Die Senkung der Serum-Bilirubinkonzentration durch Bestrahlung kommt vermutlich durch mehrere Mechanismen zustande, unter denen die beschleunigte Exkretion von Metaboliten in die Gallenwege eine besondere Bedeutung hat (siehe auch LUCEY, 29).

Über den Einfluß von Licht auf ikterische Tiere bzw. hyperbilirubinämische Neugeborene, die mit bestimmten Pharmaka behandelt wurden, liegen nur wenige Arbeiten vor.

Unsere Untersuchungen weisen darauf hin, daß die Bestrahlung der ikterischen Tiere mit blauem Licht die "Toxizität" derjenigen Medikamente und Lösungsmittel mindern kann, die mit dem Bilirubin um die Proteinbindung konkurrieren.

Dieses Ergebnis war insofern zu erwarten, als diese Präparate die Konzentration an freiem Bilirubin im Serum erhöhen, was eine verstärkte Ablagerung des lipophilen Farbstoffs im Fettgewebe, darunter auch im subcutanen Fett, zur Folge hat. Dort zerfällt der Farbstoff unter Lichteinwirkung. Seine Ganglienzelltoxizität verschwindet. Dies ändert jedoch nichts an der Tatsache, daß die Präparate an sich durch die Erhöhung des freien Bilirubins die Gefahr einer Bilirubinzephalopathie erheblich heraufsetzen. Die Anwendung derartiger Medikamente sollte bei Neugeborenen, besonders, wenn sie ikterisch sind, unterbleiben.

Präparate, die mit dem Bilirubin nicht konkurrieren, ändern an der Situation der Bindungs- und Konzentrationsverhältnisse des Farbstoffes nichts. Ihre Anwendung hatte dementsprechend keine Änderung der Toxizität und damit der Mortalitätsrate bei bestrahlten Ratten, verglichen mit unbestrahlten, zur Folge.

5. ZUSAMMENFASSUNG

3-5 Tage alte homozygote Gunn-Ratten erhielten eine Injektion von Sulfisoxazol (Gantrisin), Sulfadimethoxin (Madribon), Gentamicin (Refobacin L, 10mg und 40mg) sowie Novobiocin (Albamyacin) und deren Hilfstofflösungen. Danach wurden sie 4 Tage lang beobachtet. Zuvor war die mittlere letale Dosis bei gleichalten heterozygoten Ratten ermittelt worden. Die den homozygoten Tieren verabreichte Dosis entsprach 50-80% dieser L.D.50. Sofort nach der Injektion wurden 50% der homozygoten Tiere zusammen mit den Rattenmüttern mit blauem Licht bestrahlt, die anderen verblieben im Dunkeln. Nach Ermittlung der Ausgangswerte wurden der Hämatokrit und die Serum-Bilirubinkonzentration 30 Minuten, 3, 24 und 48 Stunden nach der Medikamenten-Injektion bestimmt. Die Tiere wurden alle 24 Stunden gewogen.

Beim Hämatokrit ließen sich keine Differenzen zwischen bestrahlten und unbestrahlten Tieren und keine Korrelation zur Serum-Bilirubinkonzentration nachweisen. Lediglich die Feststellung ist möglich, daß der Hämatokrit mit der Zahl der Blutentnahmen abnahm.

Anhand der Serum-Bilirubinkonzentration ließ sich zeigen, daß der Wirkstoff des Refobacins keine Dissoziation der Bilirubin-Albumin-Bindung verursacht. Hingegen verursacht der Benzylalkohol in der Hilfstofflösung von Refobacin 10mg und 40mg eine deutliche Dissoziation des Bilirubin-Albumin-Komplexes. Dabei enthält Refobacin 10mg - die Säuglingsampulle - , bezogen auf das Gentamicin, 8-mal mehr Benzylalkohol als Refobacin 40mg.

Die pharmakologisch wirksamen Bestandteile des Madribons und des Gantrisins bewirken eine kräftige Verdrängung des Bilirubins aus seiner Albuminbindung.

Novobiocin verdrängt zwar wahrscheinlich primär das Bilirubin aus der Serum-Albuminbindung, beeinflusst anscheinend jedoch durch Änderung der Tertiärstruktur des Albuminmoleküls die Anzahl der Bin-

dungsstellen für das Bilirubin in der Weise, daß der dissoziierende Effekt aufgehoben wird. Die durch Novobiocin verursacht Hemmung der Glucuronyltransferase spielt bei der homozygoten Gunn-Ratte keine Rolle.

Bei der Prüfung der den Handelspräparaten beigegebenen Hilfsstoffe (Stabilisatoren) wurde deutlich, daß vor allem Benzolderivate (Benzylalkohol in Refobacin 10mg und 40mg, Na-Benzoeat, Benzoessäure und Benzylalkohol in Valium injectabile) einen verdrängenden Effekt auf das Albumin-gebundene Bilirubin ausüben.

Die anderen untersuchten Lösungsvermittler (Dimethylacetamid, Na₂-EDTA, Na-Pyrosulfit, Lidocain, Diäthanolamin und Nicotinamid) zeigten keine Konkurrenz mit dem Bilirubin.

Die Phototherapie führte in fast allen Fällen zur Senkung der Bilirubinkonzentration und damit zur Verminderung der Intensität des Kernikterus. Von den homozygoten Kontrolltieren ohne Medikamente überlebten im Licht 88%, im Dunkeln hingegen nur 65%. Die Serum-Bilirubinkonzentration lag nach 24 Stunden bei den bestrahlten Kontrolltieren gegenüber den unbestrahlten um ca. 35% niedriger. Die Phototherapie kann die Toxizität von Medikamenten und Lösungsmitteln, die mit dem Bilirubin um die Bindung am Serum-Albumin konkurrieren, durch Abbau und beschleunigte Exkretion des frei werdenden Bilirubins vermindern. Auf heterozygote Tiere bleibt die Phototherapie ohne Einfluß.

Zwei Dinge sollten besonders hervorgehoben werden:

Bei der Applikation von Pharmaka ist zu bedenken, daß Nebenwirkungen möglicherweise durch die darin enthaltenen Lösungsvermittler bedingt sein können. Da die Pharmakologie der Lösungsvermittler, von wenigen Ausnahmen abgesehen, ein bisher stark vernachlässigtes Gebiet darstellt, sollte man spezielle Untersuchungen der Stabilisatoren unter besonderer Berücksichtigung ihrer Toxikologie anregen. Ferner muß, wie dies bereits in USA geschehen ist, eine Deklaration der Zusammensetzung der Lösungsvermittler auf den Beipackzetteln der Präparate gefordert werden. Nur so können Schäden verhindert werden, die auf Wirkungen nicht deklarierter Hilfsstoffe zurückgehen.

6. LITERATURVERZEICHNIS

- 1) JOHNSON, L., SARMIENTO, F., BLANC, W.A., DAY, E.:
Kernicterus in Rats with an Inherited Deficiency
of Glucuronyl Transferase
Amer. J. Dis. Child. 97: 591-608, 1959
- 2) JOHNSON, L., GARCIA, M. L., FIGUEROA, E., SARMIENTO, F.:
Kernicterus in Rats Lacking Glucuronyl Transferase
Amer. J. Dis. Child. 101: 322-349, 1961
- 3) SILVERMAN, W. A., ANDERSEN, D. H., BLANC, W.A., CROZIER,
D. N. :
A Difference in Mortality Rate and Incidence of Kern-
icterus Among Premature Infants Allotted to two Pro-
phylactic Antibacterial Regimens
Pediatrics 18: 614-625, 1956
- 4) YEARY, R. A., DAVIS, D. R.:
Protein Binding of Bilirubin: Comparison of in-Vitro
and in-Vivo Measurement of Bilirubin Displacement by
Drugs
Toxicology and Applied Pharmacology 28: 269-283, 1974
- 5) SCHUTTA, H. S., JOHNSON, L.:
Clinical signs and morphologic abnormalities in Gunn-
-rats treated with sulfadimethoxine
J. of Ped. 75, No 6 part 1: 1070-1079, 1969
- 6) SCHOLTAN, W., SCHMID, J.:
Die Bindung der Antibiotika an die Eiweißkörper des
Serums
Arzneimittel-Forsch. 13: 288-294, 1963

7) SCHOLTAN, W.:

Die Bindung der Antibiotika an die Eiweißkörper des Serums

Arzneimittel-Forsch. 13: 347-360, 1963

8) FINLAND, M., NICHOLS, R.:

Novobiocin

Antibioti. et Chemother. 4: 209-392, 1957

9) MALAKA-ZAFIRIU, K., STRATES, B. S.:

The effect of antimicrobial agents on the binding of bilirubin by albumin

Acta Paediat. Scand. 58: 281-286, 1969

10) SUTHERLAND, J. M., KELLER, W. H., CINCINNATI, B. S.:

Novobiocin and neonatal hyperbilirubinemia

Amer. J. Dis. Child. 101: 447-453, 1961

11) GLEISS, J.:

Hyperbilirubinämie bei unreifen Neugeborenen im Gefolge medikamentöser Prophylaxe des Staphylokokken-Hospitalismus

Z. Kinderheilkunde 86: 280-288, 1962

12) HSIA, D. Y., DOWBEN, R. M., RIABOU, S.:

Inhibitors of glucuronyl-transferase in the newborn

Ann. N. Y. Acad. Sci., 111: 326-336, 1963

13) LOCKIETZ, H., DOWBEN, R. M., HSIA, D. Y.:

Studies on the effect of novobiocin on glucuronyl-transferase

Pediatrics 32: 47-51, 1963

- 14) YEARY, R. A., GERKEN, D., DAVIS, D. R.:
Postnatal development of hepatic drug-metabolizing
enzymes in the Gunn-rat
Biol. Neonate 23: 371-380, 1973
- 15) STERN, L.:
Drug interactions - part II: Drugs, the newborn in-
fant and the binding of bilirubin to albumin
Pediatrics 49: 916-918, 1972
- 16) ODELL, G. B., CUKIER, J. O., SEUNG DAMRONG, S., ODELL,
L. J.:
The in-vitro and in-vivo dissociation of bilirubin
from albumin by gentamicin
Symposium on bilirubin-metabolism, Jerusalem 1974
- 17) ODELL, G. B., COHEN, S. N., KELLY, P. C.:
Studies in kernicterus II. The determination of the
saturation of serum albumin with bilirubin
J. Pediat. 74: 214-230, 1969
- 18) WINDORFER JR. A., MIHAILOVA, K.:
Der Einfluß verschiedener Medikamente und pH-Werte
auf die Albumin-Bilirubinbindung in vitro
Z. Kinderheilkunde 114, 83-92, 1973
- 19) WINDORFER JR, A., MIHAILOVA, K., PRINGSHEIM, W.:
Besteht erhöhte Gefahr einer Bilirubinenzephalopathie
im Neugeborenenalter durch eine medikamentöse Thera-
pie?
Dtsch. Med. W. Schr. 98: 1260-1267, 1973

- 20) BLONDHEIM, S. A., KAPITULNIK, J., VALAES, T., KAUFMANN, N. A.:

Use of a sephadex column to evaluate the bilirubin-binding capacity of the serum of infants with neonatal jaundice

Israel Journal of Medical Sciences 8: 22-28, 1972

- 21) MALAKA-ZAFIRIU, K., TSIOURIS, I., CASSIMOS, C.:

The effect of gentamicin on liver glucuronyl transferase

J. Ped. 82: 118-120, 1973

- 22) SCHIFF, D., CHAN, G., STERN, L.:

Fixed drug combinations and the displacement of bilirubin from albumin

Pediatrics 48: 139-141, 1971

- 23) BALLOWITZ, L., HANEFELD, F.:

Phototherapy of infant guinea-pigs under the influence of different drugs

Birth defects, Original article series, im Druck

- 24) ANSCHEL, J.:

Lösungsmittel und Lösungsvermittler in Injektionen

Pharm. Ind. 27: 781-787, 1965

- 25) FIEDLER, M.:

Lexikon der Hilfsstoffe für Pharmazie, Kosmetik und angrenzende Gebiete

Editio Cantor KG, Aulendorf i. Württ., 1971

- 26) THE MERCK INDEX

An encyclopedia of chemicals and drugs

Published by Merck & Co., Inc.

Rahway, N. J., USA. 1968

- 27) KREYBIG, T. v., PREUSSMANN, R., KREYBIG, I. v.:
Chemische Konstitution und teratogene Wirkung bei
der Ratte, II
Arzneimittel-Forsch. 19, 1073-1076, 1969
- 28) OSTROW, J. D., BRANHAM, R. V.:
Photodecay of bilirubin in vitro and in vivo in
jaundiced (gunn) rat
Birth Defects, Original article series, Vol. VI,
No. 2, 93-99, 1970
- 29) LUCEY, J. F.:
The effects of light on the newly born infant
J. Perinat. Med. I, 147-152, 1973
- 30) WALTER, A. M., HEILMEYER, L.:
Antibiotika-Fibel
Antibiotika und Chemotherapie
3. Aufl., Georg-Thieme-Verlag, Stuttgart, 1969
- 31) STUDER, A., ZBINDEN, G., UEHLINGER, E.:
Die Pathologie der Avitaminosen - Toxikologie
der übrigen Vitamine
Hb. allg. Pathol. 11, 984, 1962
- 32) FRANZ, J. W., JÄHNCHEN, E., KRIEGLSTEIN, J.:
Der Einfluß verschiedener Pharmaka auf das
Bindungsvermögen einer Albuminlösung für Promazin
und Chlorpromazin
Arch. Pharmak. 264, 462-475, 1969

Lebenslauf

Am 21. September 1949 wurde ich in Lemgo/Lippe als drittes von fünf Kindern des Ehepaares Dr. med. Rudolf Schmid und Dr. med. Anne-Lore Schmid, geb. Kleßmann, geboren. Ich wuchs in Leonberg/Württ. auf, ging dort von 1956-1960 in die Volksschule, wechselte dann auf das Gymnasium nach Korntal und schloß dort 1969 mit dem Abitur ab.

Mein Medizinstudium begann ich in Kiel, wo ich meine ersten beiden Semester bis zum Vorphysikum im Sommersemester 1970 verbrachte. Es folgten vier Semester in Würzburg. In dieser Zeit, im Wintersemester 1971/72, bestand ich die ärztliche Vorprüfung. Nach dem Sommersemester 1972 wechselte ich nach Berlin über, wo ich im Sommer 1975 das Staatsexamen ablegte. Seit Dezember 1975 arbeite ich auf der chirurgischen Abteilung des Auguste Victoria Krankenhauses, Berlin-Schöneberg, als Medizinalassistent.

Frau Prof. Dr. L. Ballowitz schulde ich ganz besonders Dank für die Überlassung des Themas, für ihre Geduld und ihre ständige Bereitschaft, auf meine Fragen einzugehen. Besonders bei der Schlußdurchsicht der Arbeit stand sie mir mit Rat und Tat zur Seite.

Weiterhin möchte ich mich bei den medizinisch-technischen Assistentinnen Frau S. Wollermann und Frau Ch. van Eckeren für ihre Hilfe bedanken, außerdem bei den Tierpflegern Frau R. Ludwig und Herrn A. Dinzel.

Für die Bereitstellung der Injektionslösungen sei den folgenden Firmen Dank gesagt: Hoffmann- La-Roche für Madribon und Gantrisin, Bayer/Schering für Durenat, Böhringer (Mannheim) für Gramaxin, Upjohn für Albamycin und Merck für Refobacin. Merck stellte außerdem folgende Substanzen zur Verfügung: Benzylalkohol, Na_2 -EDTA (Titriplex) und Dimethylacetamid.

